



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

PAULA ARAUJO MONTEIRO MAFRA

“Croton campestris A.St.-Hil. : atividades antitumoral e anti-
inflamatória”

CAMPINAS

2017

PAULA ARAUJO MONTEIRO MAFRA

***“Croton campestris A.St.-Hil. : atividades antitumoral e
anti-inflamatória”***

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos exigidos para
obtenção do Título de Doutora em Biologia
Celular e Estrutural na área de Biologia
Celular.

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA PAULA ARAUJO MONTEIRO MAFRA
E ORIENTADA PELO PROF. DR. JOÃO
ERNESTO DE CARVALHO.

Orientador: PROF. DR. JOÃO ERNESTO DE CARVALHO

Coorientadora: DR.^a DÉBORA BARBOSA VENDRAMINI COSTA

Coorientadora: PROF.^a DR.^a MARY ANN FOGLIO

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2011/22457-7

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

M764c Monteiro Mafra, Paula Araujo, 1985-
Croton campestris A.St.-Hil. : atividades antitumoral e anti-inflamatória /
Paula Araujo Monteiro Mafra. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: João Ernesto de Carvalho.
Coorientadores: Débora Barbosa Vendramini Costa e Mary Ann Foglio.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Biologia.

1. *Croton campestris*. 2. Câncer. 3. Inflamação. 4. Produtos naturais. 5.
Atividade antitumoral. I. Carvalho, João Ernesto, 1954-. II. Costa, Débora
Barbosa Vendramini, 1984-. III. Foglio, Mary Ann, 1960-. IV. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. V. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: *Croton campestris* A.St.-Hil. : antitumor and anti-inflammatory activities

Palavras-chave em inglês:

Croton campestris

Cancer

Inflammation

Natural products

Antitumor activity

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

João Ernesto de Carvalho [Orientador]

Cristina Pontes Vicente

Humberto Moreira Spindola

Denise Gonçalves Priolli

Taize Machado Augusto

Data de defesa: 31-03-2017

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 31 de março de 2017

MEMBROS PARTICIPANTES DA SESSÃO DE DEFESA

Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho (Orientador)

Profa. Dra. Cristina Pontes Vicente

Profa. Dra. Denise Gonçalves Priolli

Profa. Dra. Taize Machado Augusto

Prof. Dr. Humberto Moreira Spindola

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa que se encontra no processo de vida acadêmica da aluna.

À Vó Therezinha, minha estrela bochechuda e
sorridente no céu.

“Are we all lost stars trying to light up the dark?”

Adam Levine

*“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito,
nos aproxima.”*

Louis Pasteur

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por viver sob Sua graça e Seu amor. Agradeço por ter a certeza de que os sonhos que Ele tem para a minha vida são muito maiores do que eu possa imaginar.

Agradeço ao meu marido, minha metade, Júlio, que me acompanhou tanto nos momentos prazerosos quanto nos momentos difíceis dessa jornada, me apoiando ainda que fosse preciso ficar há 1 hemisfério de distância. Ele foi a pessoa mais paciente do mundo ao entender que, ter uma esposa cientista, é muito mais complexo do que ele poderia imaginar. E, mesmo assim, foi compreensivo, companheiro e amoroso sempre que eu precisei. Obrigada por ser o meu porto seguro. Te amo. Até a lua, ida e volta.

Aos meus pais, Silma e Romeu, meu tudo, por apoiarem os meus sonhos sempre! Por terem me dado uma base tão sólida que me faz acreditar que eu posso conquistar tudo o que eu quiser! Por terem me dado um berço de ética e honestidade que pautam minha vida e carreira. Serei grata para sempre. Meu amor e admiração eternos por vocês, papai e mamãe.

À minha irmã, Carol, pelo carinho e força de sempre. Por ser minha melhor amiga e por me dar a certeza de que estará sempre ao meu lado. Literalmente, para o que der e vier. Te amo, mano.

Às minhas filhotas de quatro patas, Shamu e Blue, pela fiel companhia todos os dias da escrita desse trabalho.

Aos meus primos, mais que melhores amigos, pela força e carinho de sempre. Obrigada por tudo! Sem vocês minha vida não teria cor!

A todos os meus familiares e amigos que torcem por mim e se alegram com minhas conquistas. (Obrigada também por fazerem com que eu me sentisse uma artista internacional quando vocês lotaram o saguão do aeroporto para me receber com tanto carinho após o tempo que estive fora. Foi incrível!)

Aos meus amigos da PIBC e da Célula de Jovens Casais que oraram e me apoiaram nos momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho pela orientação e amizade.

À Prof^a. Dr^a. Mary Ann Foglio pelo papel de coorientadora.

À Dra. Débora Vendramini-Costa pela valiosíssima coorientação. O seu papel nesse trabalho é imensurável. Sinônimo de competência e perseverança, é uma inspiração a todos os jovens cientistas. À Déb, minha grande amiga, meu eterno coração agradecido!

Agradecimentos

Ao Dr. Sergei Grivennikov e sua equipe, por abrir as portas do seu grupo de pesquisa e proporcionar a renovação da minha paixão pela ciência. O que eu vivi no tempo que estive com sua equipe acrescentou de forma única à minha formação como pesquisadora e, principalmente, como pessoa.

Ao Fox Chase Cancer Center (Philadelphia, PA, EUA) por todo suporte para realização do estágio no exterior e desenvolvimento do projeto do doutorado sanduíche.

À Philly, a cidade do meu coração.

À Karen, Wei, Vivi, Ralph, Dani A., Dani D., Esteban, Besa, Janusz e Mariana. Preciosidades que encontrei em terras norte-americanas e que guardarei para sempre em meu coração. Obrigada por tornar esse tempo mais do que especial.

À mano Thaís, por me incentivar na conclusão dessa etapa, pela amizade verdadeira e pelas conversas sinceras.

Às queridas Gi L., Gi F., Lari Shiozawa e Paula pela querida amizade e os momentos deliciosos em amigas.

À Karin, minha Karíssima, pelos conselhos preciosos e pelos papos tão encorajadores. Muito obrigada mesmo!

À Sica, Ilza e Núbia por todo apoio técnico fundamental a todos os projetos.

Aos colegas de grupo, ou que já passaram por nossa equipe, Humberto, Michelle, Vanessa, Adriana, Tamires, Lúcia, Rogério, Fabi, Marianinha, Gabi, Lívia, Lidiane, Naty, Leila, Paty, Vivi, Rosana, Leilaninha e Rafael pelo companheirismo, valioso auxílio e amizade.

Ao querido Ícaro, pelos conselhos tão carinhosos e pela companhia nas infinitas horas de trabalhos de fitoquímica. Você é de ouro, menino!

À Dra. Karin Pelizzaro, pela riquíssima contribuição intelectual e experimental.

À Ana Possenti por suas delícias culinárias que acalentaram muitas tardes de trabalho.

À Aninha pelo carinho, apoio e coordenação da Divisão de Farmacologia e Toxicologia.

À Profa. Dra. Glyn Mara Figueira, Benício Pereira e a todos os funcionários do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas (CPQBA) onde foi realizado a maior parte desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pela excelência e suporte.

À querida secretária Liliam Panagio por sua eficiência e paciência.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de Doutorado (Processo n.º 2011/22457-7) e de Estágio e Pesquisa no Exterior (Processo n.º 2015/18328-8) fornecidas ao longo desse trabalho.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro e bolsa nos quatro primeiros meses de trabalho.

Aos colaboradores Prof. Dr. Walter Roman (UNOCHAPECÓ), Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho (UNIVALI) e Prof. Severino Matias de Alencar (ESALQ).

Aos membros da banca de qualificação e de defesa de Doutorado pelo aceite e pela disponibilidade para contribuir com meu trabalho.

A todos que de alguma forma participaram do desenvolvimento desse trabalho e torceram pelo meu sucesso.

Muito obrigada!

RESUMO

O aumento da expectativa de vida e de hábitos que elevam a exposição à carcinógenos vêm promovendo um aumento na incidência de câncer, já que o envelhecimento do organismo e a inflamação crônica provocada por muitos desses fatores favorecem o desenvolvimento de tumores. A quimioterapia é a estratégia mais utilizadas no tratamento do câncer e neste contexto, a maior parte dos quimioterápicos utilizados atualmente advém de fontes naturais. Por isso, o objetivo desse trabalho foi aprofundar os estudos com a espécie *Croton campestris* A.St.-Hil., avaliando a composição de suas frações ativas, além de suas atividades anti-inflamatória e antitumoral, sugerindo um mecanismo de ação. A atividade citostática foi observada em cultura de células tumorais humanas com seletividade para linhagem de pulmão. O estudo dos mecanismos de morte promovida pela fração ativa FAIII6-8 sobre essa linhagem mostrou morte não apoptótica independente de caspases, com rápida elevação de ROS e aumento na expressão de RIP1, características de morte celular por necroptose. Esse dado é importante, visto que células tumorais têm como característica a evasão de processos apoptóticos. Além disso, houve também parada no ciclo celular, perda de potencial de membrana mitocondrial, e ativação de JNK, dados que corroboram a atividade citostática observada. Em modelos experimentais *in vivo*, as frações ativas promoveram potente inibição do desenvolvimento dos tumores sólidos de Ehrlich e de carcinoma pulmonar de Lewis, além de demonstrar atividade anti-inflamatória em modelos experimentais de edema de pata, edema de orelha, peritonite e colite. Os resultados obtidos nesses modelos confirmam a atividade anti-inflamatória da fração ativa testada, como a diminuição da primeira fase da inflamação aguda, a diminuição da migração leucocitária e da expressão de diversos mediadores inflamatórios como IL-6, IL-17, COX-2 entre outros. Os dados em modelo de colite apontaram, principalmente, para a interferência do tratamento no eixo IL-23/IL-17/IL-22. Além disso, em modelo de carcinogênese associado à colite, o tratamento com a fração FAIII6-8 preveniu o desenvolvimento de tumores somente quando administrado desde as fases iniciais do processo carcinogênico, quando a inflamação atua como fator promotor. Corroborando esse dado, houve mínima influência do tratamento no modelo de carcinogênese não precedida por inflamação. Somado a esses dados, o óleo essencial dessa espécie foi aplicado sobre linhagens celulares tumorais apresentando importante atividade citostática. Portanto, a espécie brasileira *Croton campestris* A.St.-Hil. representa uma fonte de promissores agentes antitumorais e anti-inflamatórios.

ABSTRACT

The increase in life expectancy and habits that involve the exposure to carcinogens can promote the incidence of cancer, since aging and the chronic inflammation caused by many of these factors favor the development of tumors. Chemotherapy is the main strategy used in cancer treatment and in this context, most of the chemotherapies currently used are obtained from natural sources. Therefore, the aim of this work was to evaluate the composition of active fractions obtained from *Croton campestris* A.St.-Hil., together with their anti-inflammatory and antitumor activities, suggesting a mechanism of action. The cytostatic activity was observed in several human tumor cell lines, with selectivity towards lung cells. The study of the cell death mechanisms promoted by the active fraction FAIII6-8 towards these cells showed non-apoptotic and caspase-independent cell death, with rapid increase of ROS levels and expression of RIP1, characterizing necroptosis. Since one of the hallmarks of tumor cells is the evasion of apoptosis, the induction of an alternative cell death is an advantage. In addition, the cytostatic activity was confirmed by cell cycle arrest, loss of mitochondrial membrane potential and JNK activation. In the *in vivo* experimental models, the active fraction inhibited the development of Ehrlich solid tumor and Lewis Lung Carcinoma. The anti-inflammatory activity of fraction FAIII6-8 was observed in several experimental models such as paw edema, ear edema, peritonitis and colitis. In these models there was reduction of the first phase of acute inflammation, reduction of leukocyte migration and decreased expression of several pro-inflammatory mediators, such as IL-6, IL-17, COX-2 among others. The data from colitis model indicated that the treatment disrupted the IL-23 / IL-22 / IL-17 axis. In the colitis-associated carcinogenesis model, the treatment with FAIII6-8 prevented the development of tumors only when administered in the early stages of the carcinogenic process, when inflammation acts as a promoter. In accordance, there was only a mild activity of the fraction FAIII6-8 in the carcinogenic model not preceded by inflammation. In addition to these data, the essential oil from this specie was applied in tumor cell lines and showed marked cytostatic activity. Therefore, the Brazilian specie *Croton campestris* A.St.-Hil. represents a source of promising antitumor and anti-inflammatory agents.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – grau Celsius
μg – micro grama
μL – micro litro
μM – micro molar
5-LOX – 5 lipooxigenase
786-0 - linhagem tumoral humana de rim
7-AAD – 7-aminoactinomicina D
ACN – acetonitrila
AINES – anti-inflamatórios não esteroidais
ALK - receptor de tirosino quinase
ANOVA – análise de variância
AOM – azoximetano
APC - adenomatous polyposis coli
Areg - anfiregulina
ATCC - American Type Culture Collection
ATP – adenosina trifosfato
Bcl-2 – proteína célula-B de linfoma
CAC – câncer associado à colite
CAT – catalase
CCD – cromatografia de camada delgada
CCL – quimiocinas ligante do motivo C-C
CCR – câncer colorretal
CDK – ciclina dependente de quinases
CE – Ceará
CEMIB – Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
CEUA – Comissão de Ética e Uso Animal
CFqb14 – Fração 14 obtida do fracionamento b de *Croton campestris*
CG – cromatografia gasosa (GC)
CG/EM – cromatografia gasosa com detector de espectros de massa
CGEN – Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)
CO₂ – gás carbônico ou dióxido de carbono

- COX-2 – ciclooxigenase 2
- CPC – cromatografia por partição centrífuga
- CPMA – Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas
- CPQBA – Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas
- DCF – 2,7-diclorofluoresceína
- DCFH - 2,7-diclorodihidrofluoresceína
- DCFH-DA – diacetate 2,7-diclorodihidrofluoresceína
- DI – densidade de inoculação
- DL50 – dose letal para 50% dos indivíduos
- DMEM – Dulbecco's modified Eagle's meio
- DMSO – dimetilsulfóxido
- DNA – ácido desoxirribonucleico (ADN)
- Doxo – doxorubicina
- DSS – dextran sulfato de sódio
- DTT – ditioneitol
- EBA – extrato bruto por acetato de etila de *Croton campestris*
- EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético
- EGFR – receptor do fator de crescimento epidérmico
- ELISA - ensaio de imunoabsorção enzimática
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- ESALQ – Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz
- ESI – ionização por electrospray
- EUA – Estados Unidos da América
- eV – eletrovolt
- FADD – proteína com domínio de morte associada à Fas
- FAI25-31ACN – Fração 25-31 obtida do fracionamento AI do EBA e posterior purificação por acetonitrila: hexano de *Croton campestris*
- FAIII6-8 – Fração 6-8 obtida do fracionamento AIII da fração obtida da purificação por acetonitrila: hexano do EBA de *Croton campestris*
- FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- FCCC – *Fox Chase Cancer Center*
- Fig. - Figura
- GAPDH - gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase

GFAP – proteína ácida fibrilar glial
GI50 – concentração de amostra necessária para inibir 50% o crescimento celular
GST – glutathione transferase
h – hora
H&E – hematoxilina e eosina
H₂O – água
HaCat - linhagem normal humana de queratinócito
Hbg – hemoglobina
HCC – carcinoma hepatocelular
HCl – ácido clorídrico
Hct – hematócrito
HETAB – hexadecil-trimetilamonio bromido
HIF – fator induzível por hipóxia
HRESI-MS – espectrometria de massas de ionização por electrospray de alta resolução.
HT29 - linhagem tumoral humana de cólon
hTERT – telomerase transcriptase reversa humana
HTS - triagem de alto rendimento
IACUC-FCCC - *Institutional Animal Care and Use Committee of Fox Chase Cancer Center*
IARC – International Agency for Research on Cancer
IB – Instituto de Biologia
IBD – doença inflamatória intestinal (*inflammatory bowel disease*)
IC – inibição de crescimento
IFN – interferon
IL– interleucina
INCA – Instituto Nacional de Câncer
iNOS –óxido nítrico sintase induzível
IP – intraperitoneal
IR – índice de retenção
K562 – linhagem tumoral humana de leucemia
kg – quilo
K-ras - homólogo do oncogene viral do sarcoma de rato v-Ki-ras2 Kirsten

L – litro

LLC – Carcinoma pulmonar de Lewis (*Lewis Lung Carcinoma*)

LPS – lipopolissacarídeos

m – metro

M – molar

m/z – relação massa-carga

MAPK - proteína quinase ativada por mitógeno

MCF – 7 - linhagem tumoral humana de mama

MCH - hemoglobina corpuscular média, MCHC (concentração da hemoglobina corpuscular) e plaquetas (Ptl).

MCV - volume corpuscular médio

MDR1 – gene de resistência à múltiplas drogas 1

MEF - mouse embryonic fibroblastos

MET – proteína tirosino quinase Met

MeOH – metanol

mg – miligrama

MIC – concentração inibitória mínima

min – minuto

mRNA – RNA mensageiro

miRNA – micro RNA

mL – mililitro

MLKL - Mixed lineage kinase domain-like

MMP-9 –metaloproteinase de matrix 9

MPO – mieloperoxidase

MS – espectrometria de massas (EM)

NaCl – cloreto de sódio

NaF – Fluoreto de sódio

NCI – 60 – programa triagem em células tumorais humanas do NCI

NCI – National Cancer Institute

NCI-ADR/RES - linhagem tumoral humana de ovário com fenótipo de resistência a múltiplas drogas

NCI-H460 - linhagem tumoral humana de pulmão

NEMO – modulador essencial de NF- κ B

NF- κ B – fator nuclear kappa B
NIH – National Institute of Health
NIST – National Institute of Standards and Technology
JNK – quinase c-Jun N-terminal
nm – nanômetro
NO – óxido nítrico
NorA – norfloxacino
NSCLC – carcinoma de células não pequenas de pulmão
O₂⁻ - ânio superóxido
ODS – octadecil silano
OE – óleo essencial
OECD/OCDE - Organisation for Economic Co-operation and Development
OVCAR-3 - linhagem tumoral humana de ovário
PA – Pensilvânia
PBS – tampão fosfato salino
PC-3 - linhagem tumoral humana de próstata
PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas
PGE – prostaglandina
pH – potencial hidrogeniônico
PI – iodeto de propídio
ppm – parte por milhão
psi – libra por polegada quadrada
PVDF - difluoreto de polivinilideno
RB – proteína retinoblastoma
RBC – eritrócitos
Rf – coeficiente de retenção
Rho123 – rodamina 123
RIP – proteína quinase de interação com receptor
RMN – ressonância magnética nuclear
RNA – ácido ribonucleico (ARN)
ROS – espécies reativas de oxigênio (EROs)
rpm – rotações por minuto
RPMI – Roswell Park Memorial Institute (meio de cultura)

RT-PCR – reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
S100A8 - S100 calcium-binding protein A8
SCLC – carcinoma de células pequenas de pulmão
SDS - dodecil sulfato de sódio
SEM – erro médio padrão
SFB – soro fetal bovino
SOD – superóxido desmutase
SRB – sulforrodamina B
SR-VAD-FMK - sulforrodamina-valil-alanil-aspartil-fluorometil-cetona
STAT – transdutor de sinais e ativador de transcrição
T₀ – tempo zero
TBST - tampão Tris contendo tween 20
TCA – ácido tricloroacético
TGF – fator de transformação do crescimento
TGI – concentração de amostra necessária para inibir completamente o crescimento celular
TLR – toll-like receptor
TNF- fator de necrose tumoral
TNFR – receptor de fator de necrose tumoral
TO – administração tópica
TPA – 12-o-tetradecanóilphorbol-13-acetato
TRADD – receptor de fator de necrose associado a proteína com domínio de morte
TRAF – Factores associados ao receptor de TNF
U251 - linhagem tumoral humana de glioma
ua – unidades arbitrárias
UACC-62 - linhagem tumoral humana de melanoma
UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas
UNIVALI – Universidade do Vale do Itajaí
UNOCHAPECÓ – Universidade Comunitária da Região de Chapecó
UV – ultravioleta
V – volts
v – volume
VEGF – fator de crescimento do endotélio vascular

Lista de Abreviaturas

WB – western blot

WBC – leucócitos totais

WHO – World Health Organization

WNT7B- membro 7B da família da proteína Wnt

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	24
1 Câncer e Inflamação	24
2 Produtos naturais e novos medicamentos antitumorais	30
3 <i>Croton campestris</i> A.St.-Hil.	32
JUSTIFICATIVA	36
OBJETIVOS GERAIS	37
CAPÍTULO 1	38
Resumo	39
1 Introdução	40
2 Objetivo	42
2.1 Objetivos específicos	42
3 Material e métodos	43
3.1 Material vegetal	43
3.2 Processamento fitoquímico	43
3.2.1 Obtenção do extrato bruto	44
3.2.2 Fracionamentos	45
3.2.2.1 Fracionamento em coluna cromatográfica filtrante	46
3.2.2.2 Fracionamento em coluna cromatográfica clássica flash	46
3.2.3 Partição líquido-líquido	46
3.2.4 Fração CFqb14	47
3.3 Análise por cromatografia em camada delgada (CCD)	47
3.4 Investigação dos componentes químicos das frações ativas	47
3.4.1 Análise de substância isolada da fração CFqb14 por ressonância magnética nuclear (RMN)	47
3.4.2 Análise das frações FA25-31ACN e FAIII6-8 por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	48
3.4.3 Análise das frações FA25-31ACN e FAIII6-8 por espectrometria de massas de alta resolução (HRESI-MS)	48
3.5 Experimentos <i>in vitro</i>	49
3.5.1 Linhagens celulares	49
3.5.2 Biomonitoramento da atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais humanas	51
3.6 Experimentos <i>in vivo</i>	53
3.6.1 Animais	54
3.6.2 Avaliação da toxicidade aguda	54
3.6.3 Avaliação da atividade antitumoral das frações FA25-31ACN e	

<i>FAIII6-8 sobre tumor sólido de Ehrlich</i>	55
3.6.4 Atividade anti-inflamatória	56
3.6.4.1 <i>Avaliação da atividade da fração CFqb14 sobre edema de pata induzido por carragenina</i>	56
3.6.4.2 <i>Avaliação da atividade da fração CFqb14 sobre peritonite induzida por carragenina</i>	56
3.6.4.2.a Dosagem de mieloperoxidase	57
3.6.4.3 <i>Avaliação da atividade da fração FAI25-31ACN sobre edema de orelha induzido por óleo de cróton</i>	57
3.6.4.3.a Dosagem de mieloperoxidase	58
3.7 Análise dos dados	59
4 Resultados e discussão	60
4.1 Obtenção dos extratos brutos, frações ativas e biomonitoramento	60
4.2 Composição das frações ativas	72
4.2.1 <i>Glucosil-estigmasterol palmitato isolado da fração CFqb14</i>	72
4.2.2 <i>O ácido gálico é o componente majoritário das frações FAI25-31ACN e FAIII6-8</i>	77
4.2.3 <i>As frações FAI25-31ACN e FAIII6-8 apresentam componentes descritos para o gênero Croton</i>	80
4.3 Avaliação da atividade farmacológica in vivo das frações ativas de Croton campestris A.St.-Hil.	81
4.3.1 <i>A fração FAI25-31ACN apresenta DL₅₀ superior à 80mg/kg</i>	82
4.3.2 <i>As frações FAI25-31ACN e FAIII6-8 inibem o desenvolvimento tumoral do tumor sólido de Ehrlich</i>	82
4.3.3 <i>A fração CFqb14 inibe a primeira fase da inflamação em modelo de edema de pata induzido por carragenina, inibe a migração de leucócitos e diminui a concentração da enzima mieloperoxidase em modelo de peritonite induzida por carragenina</i>	94
4.3.4 <i>A fração FAI25-31ACN diminui o edema de orelha e a atividade de MPO</i>	98
5 Conclusão	102
CAPÍTULO 2	103
Resumo	104
1 Introdução	105
2 Objetivo	111
2.1 Objetivos específicos	111
3 Material e métodos	112
3.1 Citometria de fluxo	112

3.1.1	<i>Avaliação do ciclo celular</i>	112
3.1.2	<i>Avaliação da morte celular</i>	113
3.1.3	<i>Ativação de caspases</i>	114
3.1.4	<i>Avaliação da produção de ROS através de DCFH-DA</i>	115
3.1.5	<i>Avaliação do potencial de membrana mitocondrial</i>	115
3.1.6	<i>Avaliação do estresse mitocondrial através da produção de ânions superóxidos</i>	116
3.2	<i>Avaliação da expressão proteica por western blot (WB)</i>	116
3.3	<i>Avaliação da atividade antitumoral da fração FAIII6-8 sobre o carcinoma pulmonar de Lewis (LLC), tumor sólido de pulmão murino</i>	118
3.4	<i>Análise dos dados</i>	118
4	<i>Resultados e discussão</i>	120
4.1	<i>A fração FAIII6-8 causa parada do ciclo celular da fase G1 em células NCI-H460</i>	120
4.2	<i>A fração FAIII6-8 causa perda de integridade de membrana e consequente marcação por 7-AAD em células NCI-H460 sem envolvimento da ativação de caspases</i>	122
4.3	<i>A fração FAIII6-8 aumenta a produção de ânions superóxidos e peróxido de hidrogênio além de causar diminuição do potencial de membrana mitocondrial em células NCI-H460</i>	126
4.4	<i>A fração FAIII6-8 leva ao aumento da expressão de proteínas relacionadas à necroptose</i>	131
4.5	<i>A fração FAIII6-8 inibe o desenvolvimento das células de tumor de pulmão murino em modelo de tumor sólido <i>in vivo</i></i>	140
5	<i>Conclusão</i>	143
	CAPÍTULO 3	144
	Resumo	145
1	Introdução	146
2	Objetivo	149
2.1	Objetivos específicos	149
3	Material e métodos	150
3.1	Perfil de citocinas produzidas por macrófagos extraídos do peritônio e estimulados por LPS	150
3.2	Experimentos <i>in vivo</i>	151
3.2.1	<i>Avaliação da atividade da FAIII6-8 sobre colite aguda induzida por DSS</i>	151

3.2.2	<i>Avaliação da atividade da fração FAIII6-8 sobre carcinogênese associada à inflamação</i>	151
3.2.3	<i>Avaliação da atividade da fração FAIII6-8 sobre carcinogênese espontânea</i>	153
3.3	Análises histológicas	154
3.4	Análise da expressão gênica por PCR em tempo real (RT-PCR)	154
3.5	Análise de citocinas por ELISA ou Multiplex	155
3.6	Análises dos dados	155
4	Resultados e discussão	157
4.1	A fração FAIII6-8 inibe a expressão de IL-6 em macrófagos estimulados por LPS <i>in vitro</i>	157
4.2	A fração FAIII6-8 previne o desenvolvimento e agressividade de colite aguda	159
4.3	A fração FAIII6-8 inibe o desenvolvimento tumoral em carcinogênese associada à colite induzida por associação de AOM/DSS	167
4.4	A fração FAIII6-8 diminui o tamanho dos tumores em modelo de carcinogênese colorretal espontânea	177
5	Conclusão	181
	CAPÍTULO 4	182
	Resumo	183
1	Introdução	184
2	Objetivo	186
3	Material e métodos	187
3.1	Material vegetal	187
3.2	Extração do óleo essencial (OE)	187
3.3	Análise por cromatografia gasosa acoplada a detector de espectro de massas CG/EM	187
3.4	Cultura de células tumorais humanas	188
3.5	Avaliação da atividade antiproliferativa	188
4	Resultados e discussão	190
5	Conclusão	195
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	196
	CONCLUSÕES GERAIS	199
	CONCLUSÃO	200
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	201
	APÊNDICE	230
	<i>Primeira descrição botânica de <u>Croton campestris</u> A.St.-Hil.</i>	230

ANEXOS	232
1 <i>Resumo publicado</i>	232
2 <i>Artigos publicados em coautoria</i>	233
3 <i>Autorização CGEN</i>	238
4 <i>Depósito de pedido de patente</i>	242
5 <i>Aprovação IACUC-FCCC</i>	244
6 <i>Certificados CEUA</i>	245
7 <i>Declaração de direitos autorais</i>	251

INTRODUÇÃO GERAL

1. Câncer e inflamação

Com mais de 100 tipos diferentes, o câncer está entre as maiores causas de morte no mundo. Ele é definido como conjunto de doenças nas quais as células anormais podem se dividir e crescer desordenadamente, sendo capazes de invadir outros tecidos, podendo se espalhar pelo corpo através do sistema circulatório estabelecendo-se em outros órgãos e tecidos (NCI, 2017). Seja pelo aumento da expectativa de vida, mudança nos hábitos alimentares ou aumento dos poluentes e do contato com carcinógenos, o câncer é um dos maiores problemas de saúde pública atualmente (Monteiro et al., 2014; Siegel et al., 2016; Wang et al., 2016a).

Segundo o relatório GLOBOCAN de 2012, houve mais de 14 milhões de novos casos de câncer no mundo com 8,2 milhões de mortes direta ou indiretamente causadas pela doença. Hoje, são mais de 32,6 milhões de pessoas vivendo com a doença, ou seja, estão dentro dos 5 anos da data de diagnóstico. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, o número de casos passará de 23 milhões nas próximas duas décadas sendo que 60% dos novos diagnósticos ocorrem na África, Ásia, América Central e do Sul, e 70% das mortes por essa patologia ocorrem nessas mesmas regiões (IARC, 2011; WHO, 2017).

Existem diversos tipos de câncer que acometem diferentes órgãos e sistemas. O carcinoma é a classificação dada ao câncer que se inicia na pele ou em tecidos que delimitam ou revestem órgãos internos. Adenocarcinomas são tumores advindos de epitélio glandular. Já sarcoma é a neoplasia que se inicia nos ossos, cartilagens, gordura, músculos, vasos sanguíneos ou outro tecido conjuntivo ou de suporte. No caso dos cânceres desenvolvidos em células sanguíneas eles são classificados linfoma (células da linhagem linfóide), mieloma (células da linhagem mielóide) e leucemia (células sanguíneas precursoras na medula óssea, os blastos) (NCI, 2017).

Os tipos de câncer com maior incidência no mundo são os de pulmão (13%), mama (11,9%) e o colorretal (9,7%), com 19,4%, 6,4% e 8,5% de mortalidade respectivamente (IARC, 2011; NCI, 2017;). Dentre esses, o câncer de pulmão tem um aumento de 2% em sua incidência mundial a cada ano, sendo um dos tipos de câncer mais agressivos, com razão mortalidade/incidência de cerca de 90% (Torre et al., 2016a). O terceiro tipo de câncer mais comumente diagnosticado é o câncer colorretal (CCR), sendo que 1% dos casos estão relacionados com desordens hereditárias, cerca de 3% são relacionados à síndrome de Lynch e 95% são esporádicos, não estando relacionados à predisposição genética (Irrazabal et al., 2014).

No Brasil a estimativa para o biênio 2016-2017 aponta que o câncer de intestino chegará a 7,8 dos novos casos de câncer nos homens e 8,6% nas mulheres, e o câncer de pulmão atingirá 8,1% dos cânceres em homens e 5,3% em mulheres (INCA, 2015).

No geral, salvo exceções, a incidência mais alta de câncer em ambos os sexos ocorre em países com alta renda da América do Norte e Europa Ocidental, juntamente com o Japão, Coreia, Austrália e Nova Zelândia. As taxas intermediárias ocorrem na América Central e do Sul, e Europa Oriental e em grande parte do sudeste asiático, incluindo China. Já a menor incidência é observada em grande parte da África e do Oeste e do Sul da Ásia, incluindo a Índia. No entanto, o Uruguai, por exemplo, é uma exceção uma vez que está na categoria de alta incidência, devido ao alto número de casos de câncer de pulmão e outros tipos de câncer relacionados ao tabagismo. Outro exemplo é a Mongólia, que apresenta uma elevada taxa de câncer de fígado, resultado da alta prevalência de infecção por hepatite B e C (Stewart & Wild, 2014; NCI, 2017).

A disparidade regional está refletida na diferença entre as incidências dos diferentes tipos de câncer, que são afetadas afetada pelos fatores de risco e sua detecção, tipo de comportamento cultural individual e também pela disponibilidade de tratamentos. Nesse contexto, os principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer são o fumo (pulmão, colorretal, estômago e fígado), o alcoolismo (estômago, colorretal e fígado), o sobrepeso, a obesidade e o sedentarismo (mama e colorretal), e infecções (fígado, estômago, colorretal, cervical) (Torre et al., 2016b). Além disso, também estão fatores como maior contato com ambientes ricos em carcinógenos, tais como grandes centros urbanos, alimentos industrializados e contendo agrotóxicos (Ruiz & Hernandez, 2014; Marley & Nan, 2016). E outro fator relacionado diretamente à biologia do câncer é o envelhecimento celular, obviamente mais proeminente com o aumento da expectativa de vida, que também é afetado pela exposição prolongadas à carcinógenos e fatores de estresses (Payne, 2014; Smetana et al., 2016).

Os mecanismos que levam ao surgimento de um tumor são influenciados diretamente pelos fatores de risco aos quais aquele tecido está exposto ou por fatores internos, ou seja, determinados geneticamente pela hereditariedade. Isso porque eles afetam, entre outros itens celulares, o material genético. Assim, os resultados das mutações gênicas podem culminar em acúmulo dessas em novas células, as quais apresentarão fenótipos anormais. Essas modificações no DNA celular causam danos críticos como programa de crescimento celular alterado, levando à geração de populações celulares que se multiplicam indevidamente e influenciando o tecido em sua forma arquitetural e em seu funcionamento fisiológico

(Weinberg, 2008). Assim, essas alterações epigenéticas, muitas vezes deletérias conferem à célula cancerígena uma vantagem seletiva, tornando-a apta a se desenvolver melhor e mais rápido naquele tecido que as células normais. Isso é possível pois, com o ganho/perda de função, os oncogenes passam a estimular a proliferação, crescimento e estabelecimento da colônia tumoral, enquanto os genes supressores de tumor são bloqueados, criando uma população de células aberrantes com propriedades necessárias para o estabelecimento de uma neoplasia (Alberts et al., 2010). Assim, a célula cancerígena é capaz de quebrar barreiras à proliferação celular como a perda do contato célula-célula, senescência, hipóxia, acidose, isquemia, dentre outras (Vendramini-Costa & Carvalho, 2012). Dessa forma, as células cancerosas manifestam, em graus variados, cinco características principais que as distinguem das células normais: proliferação descontrolada, desdiferenciação, perda de função, invasividade e metástase (Rang et al., 2007).

A carcinogênese é dividida didaticamente em três fases: iniciação, promoção e progressão tumoral. De modo geral, quando o tumor é classificado como maligno, ele ainda apresenta uma etapa extra que é a invasividade, ou seja, a capacidade de penetrar a lâmina basal dos tecidos infiltrando-se progressivamente em tecidos próximos ou mesmo distantes, pelo processo de metástase.

O primeiro estágio da carcinogênese, a iniciação, é resultado da ação dos agentes cancerígenos ou carcinógenos que provocam modificações genéticas irreversíveis como uma ou mais mutações, transversões, transições ou pequenas deleções no DNA. Nessa fase não é possível detectar o tumor clinicamente, no entanto as células encontram-se "iniciadas" para a etapa de promoção. Nesse estágio, as células "iniciadas" sofrem o efeito dos agentes cancerígenos classificados como oncopromotores, que vão modular a expressão gênica de forma a transformar as células "normais" em células malignas. Esse processo é dado pela ação de promotores e pode ser suprimido caso esse estímulo de promoção seja controlado. Assim, para que ocorra essa transformação celular, é necessário um longo e contínuo contato com o agente cancerígeno promotor. Como exemplo de agentes iniciadores e promotores, os chamados oncoaceleradores ou carcinógenos, temos a ação prolongada a hormônios, à fatores irritativos (como fumo e álcool), infecções, injúria tecidual constante e inflamação. A fase final e irreversível da carcinogênese é a progressão, na qual ocorre a multiplicação descontrolada de células já alteradas. Nesse ponto, portanto, a neoplasia está instalada e evolui até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença (Pitot et al., 1993; Karin & Greten, 2005; Vendramini-Costa & Carvalho, 2012; INCA, 2017)

O aparecimento de uma célula maligna e do conjunto de fatores que contribuirão para a formação de um câncer, refletem essa doença como um processo multifatorial que envolve diversas características. São os chamados *hallmarks* do câncer, que são as diferentes características biológicas apresentadas ao longo do desenvolvimento tumoral, tais como a manutenção da sinalização proliferativa, insensibilidade aos fatores de crescimento, evasão à morte celular programada, capacidade de replicação ilimitada, indução de angiogênese e ativação de invasão tecidual e metástase. Com o passar do tempo, a evolução da biologia celular e molecular, outros *hallmarks* foram incluídos como a instabilidade genômica e mutações, que aceleram a aquisição dessa malignidade, a desregulação energética celular, o escape da destruição pelo sistema imunológico e a inflamação relacionada ao tumor (Hanahan & Weinberg, 2011).

A atualização dos conceitos envolvidos como *hallmarks* veio com o entendimento do tumor não apenas como um conjunto de células cancerígenas em proliferação descontrolada, mas sim, como um conjunto de estruturas que formam um novo e complexo tecido, formado por diferentes componentes celulares e estruturais. Dessa maneira, estabeleceu-se a importância do microambiente tumoral como um local dinâmico com células tumorais envolvidas em matriz extracelular e rede vascular, células não malignas como fibroblastos células do sistema imune e células endoteliais (Hanahan & Coussens, 2012; Vendramini-Costa & Carvalho, 2012; Liu et al., 2014).

Nesse contexto, a inflamação é um dos mais importantes estímulos do microambiente tumoral durante a carcinogênese, e como já citada, é categorizada como um *hallmark* do câncer (Hanahan & Weinberg, 2011; Vendramini-Costa et al., 2017). E apesar de ser um tema que têm ganhado muita visibilidade nos últimos anos, o *link* câncer-inflamação foi notado há mais de um século, quando houve relatos da presença de leucócitos no tecido tumoral e quando foi associada pela primeira vez o surgimento de tumores a partir de regiões inflamadas (Balkwill & Mantovani, 2001; Mantovani, 2005). Portanto, muito embora seja caracterizada por ser uma reação protetiva localizada à uma irritação, injúria ou infecção, evidenciada por dor, vermelhidão, edema e, algumas vezes, perda de função, a inflamação tem tido uma nova percepção sobre seu papel em uma ampla variedade de doenças, incluindo o câncer (Aggarwal et al., 2006; Shalapour & Karin, 2015).

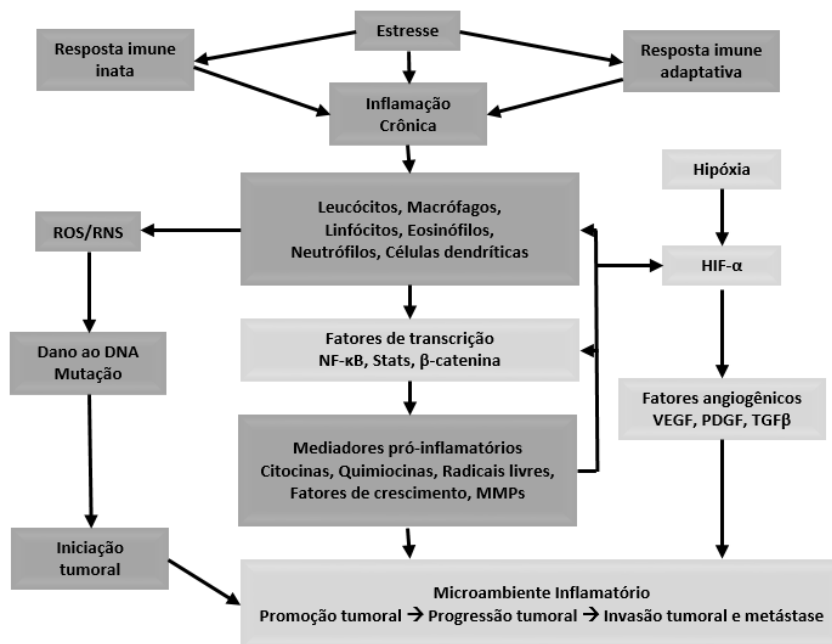
Quatro componentes principais compõem a resposta inflamatória: indutores inflamatórios, os sensores que os detectam, os mediadores inflamatórios induzidos por esses sensores, e os tecidos alvo que são afetados pelos mediadores inflamatórios. Assim, em resposta à estímulos internos e externos ao ambiente corporal e, com a perturbação da homeostase

tecidual, uma série de eventos participam do processo inflamatório sendo que as vias inflamatórias ativadas e, consequentemente, o resultado do processo inflamatório dependerá da natureza, intensidade e duração do estímulo (Medzhitov, 2010). Enquanto a inflamação aguda é parte de uma resposta de defesa, a inflamação crônica pode levar à uma série de doenças como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, pulmonárias e neurológicas (Aggarwal et al., 2006; Medzhitov, 2010; Hanahan & Weinberg, 2011; Gasparrini et al. 2017). Isso porque a inflamação aguda inicia-se rapidamente e tem uma duração relativamente curta, tendo como características a secreção de fluidos (gerando o edema) e proteínas plasmáticas, com migração predominantemente de neutrófilos (Naugler & Karin, 2008; Galdiero et al., 2013). Já a inflamação crônica é mais persistente e determina um cenário inflamatório mais complexo, podendo haver fibrose e necrose tecidual (Robbins et al., 2004; Aggarwal et al., 2006; Mantovani et al., 2017).

Nesse sentido, macrófagos e mastócitos liberam mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas, ROS, que irão contribuir, por exemplo, para indução da mobilização de leucócitos e infiltração dessas células no local da injúria, estabelecendo o processo inflamatório (Vendramini-Costa et al., 2015; Souza et al., 2017). Assim, a constante ativação de células imunes e secreção de mediadores inflamatórios podem levar ao dano tecidual e, consequentemente, à prejuízos celulares e danos ao DNA. Isso, somado ao aumento de fatores inflamatórios que levam à proliferação celular, consiste no estabelecimento de um contexto favorável ao desenvolvimento de uma população de células alteradas (Porta et al., 2009).

Além disso, dentro de um cenário de promoção tumoral, genes pró-inflamatórios têm sido identificados como mediadores críticos na supressão de apoptose, proliferação, angiogênese, invasão e metástase. Dentre os produtos desses genes estão TNF e família, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18, quimiocinas, MMP-9, VEGF, COX-2 e 5-LOX, sendo a expressão desses genes regulada principalmente pelo fator de transcrição NF-kB, que está constitutivamente ativo na maioria dos tumores e é induzido por carcinógenos (Aggarwal et al., 2006; Boshtam et al., 2017).

A figura 1 sumariza os diversos fatores causadores, as células, os mediadores, as moléculas e diversos atores interconectados nos processos do câncer e da inflamação, apresentando um panorama geral das vias envolvidas nas duas patologias.

Figura 1: Conexões entre a inflamação crônica e a tumorigênese.

Fonte: Adaptado de Vendramini-Costa & Carvalho, 2012.

Ainda em tempo, é importante salientar que a relação câncer-inflamação apresenta duas vias. A via extrínseca é referente ao cenário inflamatório favorecendo o desenvolvimento do tumor. Já na via intrínseca, o próprio ambiente tumoral e suas células estimulam o início do processo inflamatório, como é o caso do evento “*Tumor elicited inflammation*”, ou seja, inflamação provocada por tumor (Grivennikov et al., 2010). Assim, ainda que o tumor não tenha sua gênese num tecido cronicamente acometido por uma inflamação, estabelecida a massa tumoral, as células inflamatórias são sempre parte do microambiente tumoral (Colotta et al., 2009; Vendramini-Costa, 2012).

Portanto, visto o ambiente inflamatório crônico como um componente crucial para tumores que se desenvolvem a partir de condições de inflamação crônica, esse cenário contribui com a indução, promoção e progressão da carcinogênese e construção do microambiente tumoral propício para a instalação do câncer (Greten et al., 2004; Vendramini-Costa & Carvalho, 2012; Grivennikov, 2013; Francescone et al., 2014). Além disso, sabe-se que mais de 20% de todos os cânceres estão relacionados a infecções crônicas ou inflamações, como o caso da doença inflamatória intestinal levando ao câncer colorretal, a bronquite levando ao câncer de pulmão, a prostatite culminando no câncer de próstata e outros (Greene et al., 2011).

Finalmente, considera-se o microambiente tumoral como um componente chave da formação do tumor, especialmente devido ao aspecto inflamatório. Portanto, a inflamação crônica afeta muitos aspectos do desenvolvimento tumoral tanto em sua iniciação, quanto

promoção e progressão. Dessa forma, o desenvolvimento de novas terapias anticâncer que foquem não apenas na biologia celular das células tumorais, mas também no ambiente tumoral como um todo, é apontado como uma abordagem mais efetiva e tem sido o foco de muitos estudos que buscam novos componentes ativos anticâncer (Bissel & Hines, 2011; Vendramini-Costa & Carvalho, 2012; Todoric et al., 2016; Mantovani et al., 2017)

2. Produtos naturais e novos medicamentos antitumorais

Dentre os tratamentos aplicados no câncer, a quimioterapia tem um papel central. São diversas classes medicamentosas que incluem quimioterápicos contendo agentes alquilantes (clorambucil, ciclofosfamida), antimetabólitos (5-fluorouracil, metotrexato), antibióticos carcinolíticos (bleomicina, dactinomicina, doxorrubicina) e inibidores mitóticos (vincristina, vinblastina e paclitaxel) entre outros (Rang et al., 2007). Assim, na busca por tratamentos efetivos contra o câncer, tanto o foco molecular, pautado no estudo de receptores, vias, proteínas e enzimas envolvidas na morte de células cancerosas, quanto a abordagem focada no potencial farmacológico escondido na imensa biodiversidade que possuímos, têm seu papel no âmbito científico.

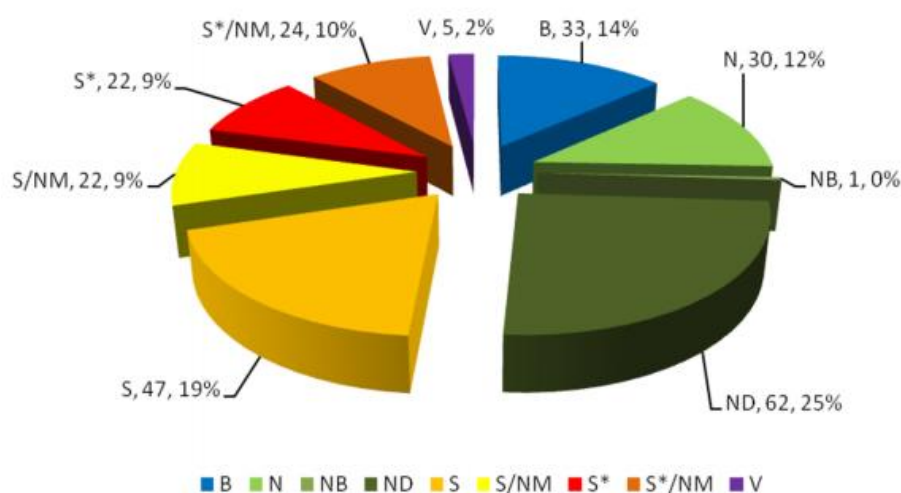
No início da história da humanidade, o homem buscava principalmente na natureza soluções para as dificuldades encontradas em seu dia-a-dia. Especialmente nas situações de patologia dos nossos ancestrais, ou mesmo ainda hoje em regiões de difícil acesso à tecnologia ou à medicamentos industrializados, a utilização da medicina natural era e é muito recorrente. Portanto, baseado no conhecimento popular, a ciência dos produtos naturais proporcionou a descoberta de muitas substâncias utilizadas hoje em dia e ainda é uma plataforma para a descoberta de novos compostos bioativos (Simões et al., 2004; Yunes & Cechinel et al., 2012; Cragg & Newman, 2013; Cheuka et al., 2016;).

Dentro do cenário de substâncias utilizadas no tratamento do câncer, os produtos naturais têm um papel central já retratado por diversos autores da área (Kingston & Newman, 2005; Khazir et al., 2014;). Uma das referências mais citadas nesse âmbito é o trabalho de Newman e Cragg (2016) que vêm acompanhando a origem das substâncias utilizadas na clínica para o tratamento do câncer desde 1981 até 2014 e mostraram que cerca de 83% das substâncias são diretamente obtidas ou derivadas de produtos naturais (Fig. 2). Além disso, 25% das drogas prescritas no mundo hoje são de origem vegetal, enfatizando as plantas e seus derivados sintéticos como importantes fontes de medicamentos (Cragg et al., 2014). Assim, os produtos naturais como fonte de compostos promissores têm sido apontados como um dos caminhos para

a descoberta de novas drogas anticâncer (Balunas & Kinghorn, 2005; Mesquita et al., 2009; Siu et al., 2011; Newman & Cragg, 2016).

Outro dado que reforça a importância do estudo dos produtos naturais é que entre os anos de 1981 e 2002, das 65 novas drogas registradas, 48 foram obtidas de produtos naturais (Safarzadeh, et al., 2014). Dois exemplos bem conhecidos de substâncias utilizadas no tratamento de tumores já supracitados, são os alcalóides da vinca (vinblastina e vincristina), que são extraídos da planta *Catharanthus roseus* (Kingston, 2009), e o paclitaxel, obtido da árvore *Taxus brevifolia* (Zhao et al., 2016). Dessa forma, esses dados refletem a grande diversidade estrutural dos produtos naturais e suas inúmeras complexas características químicas e biológicas os tornam atraentes como fonte para a busca de novas entidades moleculares com atividade farmacológica (Khaybullin et al., 2014; Ouyang et al., 2014).

Figura 2. Origem das drogas anticâncer descritas de 1940 a 2014.



Somando os produtos naturais *per se*, ou os produtos baseados em produtos naturais ou mímicos de produtos naturais, obtém-se que 83% dos medicamento anticâncer têm origem natural. B: macromoléculas biológicas; N: produto natural inalterado; NB: droga botânica (mistura definida); ND: derivado de produto natural; S: droga sintética; S*: droga sintética com farmacóforo natural; V: vacina; /NM: mímico de produto natural. Fonte: Newman & Cragg, 2016.

Com o advento da cultura de células e a obtenção de diversas linhagens celulares oriundas de tumores humanos, foi possível o desenvolvimento de uma ampla gama de metodologias para estudos *in vitro* (Itharat et al., 2004, Chabner & Roberts Jr., 2005). Assim, com o objetivo de focar na descoberta de novas substâncias ativas, o *National Cancer Institute* nos Estados Unidos desenvolveu um programa de triagem de novos agentes antitumorais, o NCI-60 (Nobili et al., 2009). Com um painel de 60 linhagens tumorais oriundas de oito tipos de tumores sólidos (pulmão, melanoma, mama, rim, cólon, próstata, ovário, cérebro) e do sistema hematopoiético (leucemia), o NCI têm contribuído imensamente para a descoberta de

novas substâncias potencialmente antitumorais (Rubinstein et al., 1990; Skehan et al., 1990; Monks et al., 1991). Assim, essa triagem biológica é definida *High Throughput Screening* – HTS, ou seja, é uma metodologia que permite o teste de muitas substâncias em alvos biológicos determinados num curto espaço de tempo (Brandão, 2010). Baseado nesse método, porém em menor escala, a Divisão de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA/ UNICAMP realiza a triagem de diversos compostos em linhagens provenientes de diferentes tecidos humano, cedidas pelo NCI, e é um dos laboratórios de referência na testagem de novas substâncias.

Dentro desse contexto de vasta biodiversidade tão pouco explorada química e biologicamente, o Brasil é, sem dúvida, o país com a maior diversidade vegetal do planeta (Cragg & Newman, 2009; Brandão et al., 2010; Cragg et al., 2014). E foi com essa justificativa que em 2004 um amplo projeto da FAPESP, o BIOPROSPECTA (04/15410-0), reuniu diversos pesquisadores com a missão de buscar novos compostos bioativos de plantas pouco estudadas. Dentre as várias espécies que apresentaram resultados promissores, estava a planta nativa brasileira *Croton campestris* A.St.Hil.

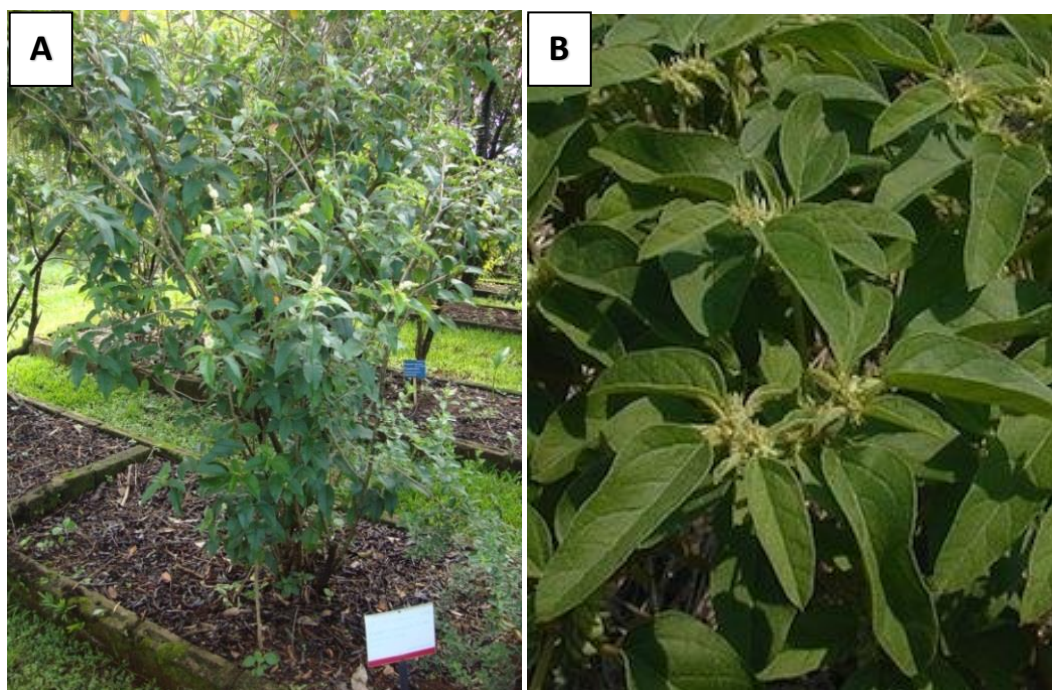
3. *Croton campestris* A.St.-Hil.

Presente principalmente em regiões tropicais e temperadas de todo o planeta, a família Euphorbiaceae apresenta cerca de 8000 espécies, distribuídas em 317 gêneros. No Brasil, é uma das famílias mais ricas em número de espécies, cerca de 1000, distribuídas em 80 gêneros, possuindo ampla distribuição com representantes em todos os diferentes tipos de vegetação do país (Sátiro & Roque, 2008). Os diversos usos das plantas contidas nessa família refletem a elevada diversidade química presente nesse grupo de plantas (Salatino et al., 2007).

Dentro das Euphorbiaceae, um dos maiores gêneros em número de espécies é o gênero *Croton* com mais de 1300 espécies amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do planeta, o que equivale à 0,5% de todas as plantas com flores descritas (Babili et al., 2009). O nome *Croton* vem do grego “*kroton*”, que significa carrapato devido à aparência de suas sementes. Várias espécies do gênero são descritas por apresentar um importante papel na medicina tradicional da África, Ásia e América do Sul. Sendo um gênero rico em constituintes químicos como terpenóides, alcaloides, compostos fenólicos e flavonóides com atividades biológicas, tem uso medicinal popular para o tratamento do tratamento de câncer, constipação intestinal, diarreia, diabetes, feridas externas, febre, hipercolesterolemia, hipertensão, inflamação, parasitoses intestinais, malária, dor, úlceras e obesidade (Nardi et al., 2003; Salatino et al., 2007; Babili et al., 2012; Nath et al., 2013;)

Conhecida popularmente como velame-do-campo, a *Croton campestris* A.St.-Hil. (Fig. 3) foi descrita no século XIX pelo botânico naturalista francês Augustin François César Prouvençal de Saint-Hilaire (apêndice). Trata-se de um arbusto nativo, não endêmico presente nos domínios da Amazônia, caatinga, cerrado e Mata Atlântica. É encontrado principalmente nas regiões sudeste e nordeste (Matias et al., 2010), mas sua distribuição geográfica compreende as cinco regiões brasileiras representadas pelos estados do Tocantins, Piauí, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Alagoas, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso do Sul, Paraná e Rio Grande do Sul (Cordeiro et al., 2010).

Figura 3. *Croton campestris* A.St.-Hil.



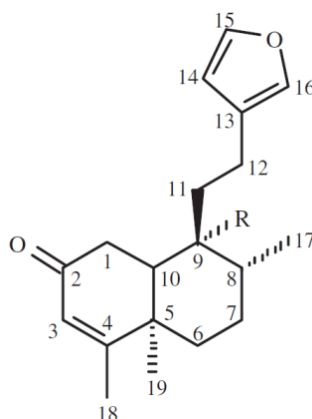
A) Imagem da planta na Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas (CPMA) do CPQBA-UNICAMP. B) detalhe das folhas.

As folhas e raízes da *C. campestris*, sob a forma de chá, são utilizadas na medicina popular como depurativo, no tratamento de doenças venéreas, de micoses cutâneas, de tumores, de moléstias de pele, de reumatismo, de úlcera do útero, da diarreia, de artrismo, de doenças inflamatórias e parasitárias, além de apresentar atividade inseticida, antimicrobiana, antihelmíntica, antimalárica e leishmanicida (Prata et al., 1993; Babili et al., 1998; Santos et al., 2005; Babili et al., 2006; Matias et al., 2010). No entanto, para a grande maioria dessas indicações, não há qualquer estudo científico realizado e há poucos componentes com atividade biológica já descritos na literatura.

Dentre os raros trabalhos já realizados com a espécie, Prata et al. (1993) isolaram três princípios do extrato etanólico obtido das folhas da planta, dos quais a taspina provocou contração do músculo reto abdominal de sapo; a 1,2,10-trihidroxi-N-óxido-crotoxinolina produziu relaxamento em preparação de traqueia isolada de cobaia; e o tetracosanoato de butila que não apresentou atividade farmacológica.

Conforme ilustrado pela figura 4, três diterpenos foram isolados do extrato diclorometânico das cascas das raízes de *C. campestris* por Babili et al. (1998), a velamona (*ent*-15,16-epoxi-2-oxo-3,13(16), 14-clerodatrien), a velamolona (*ent*-15,16-epoxi-20-hidroxi-2-oxo 3,13(16), 14-clerodatrieno) e o acetato de velamolona (*ent*-15,16-epoxi-20-acetoxi-2-oxo-3,13(16), 14-clerodatrieno). Num trabalho posterior, foi descrita a atividade moluscida contra *Bulinus truncatus* o hospedeiro intermediário do *Shistosoma haematobium*, tanto pelo tratamento com o extrato diclorometânico quanto os três componentes isolados (Babili et al., 2006).

Figura 4. Furano-diterpenos obtidos das cascas de *C. campestris*:



Velamona (R=Me), velamolona (R=CH₂OH) e acetato de velamolona (R=CH₂OAc).

Fonte: Babili et al., 2006.

Em 2005, Santos e colaboradores isolaram do extrato butanólico das partes aéreas da planta quatro flavonoides O-glicosilados: quercetina (3-O-β-D-Apiofuranosil-(1→2)-galactopiranosil quercetina), hiperina (3-O-β-D-Galactopiranosil quercetina), guajaverina (3-O-α-L-arabinopiranosil quercetina) e quercitrina (3-O-α-L-Ramnopiranosil quercetina). Foi a primeira vez que a presença dessas substâncias foi relatada em *C. campestris*.

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *C. campestris* foi obtida sobre *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus hirae* e *Candida albicans* com concentração inibitória mínima (MIC) de 1,56 µg/mL, 6,25 µg/mL e 6,25 µg/mL respectivamente (Babili et al., 2012).

Um outro estudo da atividade de extratos de *C. campestris* também apontou sua atividade antimicrobiana (Coutinho et al., 2011). Nesse trabalho os extratos modificaram a resistência à antibióticos de bactérias multirresistentes. Os autores sugerem que a atividade farmacológica, afetaria a bomba de efluxo NorA, que em alguns tipos de bactéria atua na expulsão de norfloxacino e outros antibióticos. Uma abordagem interessante desse estudo foi a estratégia de "espingarda de ervas" ou "potencialização da atividade multi-efeito" que se refere à utilização de plantas e drogas em uma abordagem usando mono ou combinações 'multi-extratos'. Nessa estratégia, diferentes componentes terapêuticos colaboram em um potencial mecanismo de ação (Ulrich-Merzenich, 2009).

Um dos trabalhos mais recentes relata a atividade antiulcerogênica de extratos das folhas e das raízes de *C. campestris*, com envolvimento de óxido nítrico e prostaglandinas. No entanto, as substâncias ativas efetivamente envolvidas na atividade farmacológica da planta ainda não foram descritas (Brito Júnior et al., 2013; Brito Júnior et al., 2014). O mesmo grupo investigou o potencial citotóxico do extrato hidroalcoólico das folhas da espécie sobre *Drosophila melanogaster*. Os componentes majoritários descritos desse extrato foram quercetina, ácido cafeico e campferol, e o consumo do extrato levou ao aumento de formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione transferase (GST). Assim, os dados indicaram que o extrato hidroalcoólico causou alterações comportamentais e mortalidade devido seus efeitos tóxicos (Brito Júnior et al., 2016).

Até o momento nenhum estudo aplicado à atividade antitumoral ou anti-inflamatória dessa espécie foi publicado. Assim, de acordo com os promissores resultados apresentados na dissertação de Mestrado já concluída (Monteiro, 2012), a atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais e o potente efeito antitumoral produzido em modelos experimentais de câncer incentivaram a continuidade dos estudos a fim de identificar os princípios ativos e elucidar seus mecanismos de ação anticâncer.

JUSTIFICATIVA

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento do projeto que deu origem à dissertação de mestrado (2010-2012) foram muito promissores inclusive com a geração de um pedido de patente (BR 102012017745-5). Os dados mostraram atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais e potente efeito antitumoral produzido em modelos experimentais de câncer *in vivo* a partir de frações obtidas de *Croton campestris*. Os excelentes resultados incentivaram, portanto, a continuidade dos estudos a fim de identificar os princípios ativos e elucidar seus mecanismos de ação anticâncer. Somado a esse fato, até o momento, não há na literatura o registro de atividade antitumoral ou anti-inflamatória dessa espécie brasileira. Portanto, além de fornecer novos dados sobre a espécie *Croton campestris*, os resultados atingidos nesse trabalho inédito embasam a obtenção de um novo agente anti-inflamatório e anticâncer, candidato a estudos clínicos.

OBJETIVOS GERAIS

O câncer é uma das doenças que mais mata no mundo todo. Cada vez mais, os eventos que ocorrem num cenário inflamatório vêm sendo associados a fatores também presentes no ambiente propício ao desenvolvimento dos tumores. Entender essa conexão tem contribuído para desenvolvimento de ferramentas que atuem de forma ampla e eficaz no estanque dos atores patológicos envolvidos. Assim, também preconizando o conhecimento farmacológico de uma espécie brasileira pouco estudada, o principal objetivo desse trabalho foi avaliar as atividades antitumoral e anti-inflamatória de frações ativas obtidas de *Croton campestris* A.St.-Hil. sugerindo os mecanismos de ação envolvidos em sua ação farmacológica, bem como elucidar as substâncias envolvidas na atividade.

Considerando o caráter multidisciplinar deste estudo a descrição do trabalho foi dividida em quatro capítulos. Os respectivos objetivos estão descritos a seguir:

Capítulo 1 – Obter frações ativas de *Croton campestris* A.St.-Hil, através do biomonitoramento em cultura de células tumorais humanas e teste preliminar de sua ação antitumoral e anti-inflamatória em modelos *in vivo*.

Capítulo 2 – Avaliar o mecanismo de ação da fração FAIII6-8 obtida de *Croton campestris* A.St.-Hil sobre células tumorais de pulmão humano e em modelo de tumor sólido *in vivo*.

Capítulo 3 – Avaliar a atividade farmacológica da fração FAIII6-8 obtida de *Croton campestris* A.St.-Hil sobre modelos de carcinogênese de cólon e colite, bem como investigar as vias celulares envolvidas em sua ação.

Capítulo 4 – Identificar os componentes do óleo essencial das folhas de *Croton campestris* A.St.-Hil bem como avaliar sua atividade antiproliferativa.

CAPÍTULO 1

Obtenção das frações ativas de Croton campestris A.St.-Hil, estudo de seus componentes, biomonitoramento em cultura de células e avaliação preliminar de sua atividade antitumoral e anti-inflamatória em modelos in vivo

CAPÍTULO 1

Resumo

Grande parte dos quimioterápicos atualmente utilizados no tratamento do câncer advém de pesquisas desenvolvidas a partir de fontes naturais. A atividade anticâncer dos extratos obtidos das folhas da *Croton campestris* A.St.-Hil. foi avaliada inicialmente pela Divisão de Farmacologia e Toxicologia em projeto financiado pela Fapesp (Fapesp-Bioprospecta 2004/07943-9). Esse trabalho teve continuidade mostrando dados importantes sobre a atividade antitumoral de frações obtidas da espécie em testes preliminares *in vitro* e *in vivo* (Monteiro, 2012). A partir desses resultados foi identificado o potencial farmacológico da fração CFqb14, com a qual foi dada continuidade aos estudos, demonstrando a sua atividade anti-inflamatória *in vivo* em modelos de edema de pata e peritonite induzidos por carragenina. Baseando-se nos resultados e características qualitativas da fração CFqb14, no trabalho atual, buscou-se a melhor estratégia de purificação das novas frações ativas, o que após a aplicação de diversas metodologias, resultou na escolha da metodologia por cromatografia filtrante e purificação por partição líquido-líquido. Em análises por espectrometria de massas, as frações obtidas apresentaram componentes já descritos para o gênero *Croton*. No entanto, através da comparação de cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência, pela primeira vez nessa espécie, foi relatada a presença de ácido gálico nas frações ativas FAI25-31ACN e FAIII6-8, sendo este o composto majoritário. As frações apresentaram atividade antiproliferativa *in vitro* com características citostáticas, e produziram potente efeito antitumoral em experimentos utilizando tumor sólido de Ehrlich, bem como em modelos para avaliação da atividade anti-inflamatória induzida por carragenina ou óleo de cróton. Dessa maneira, a comprovação das atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* das frações obtidas incentivaram o prosseguimento dos estudos dos mecanismos de ação envolvidos na atividade farmacológica de *Croton campestris* A.St.-Hil., que serão descritos nos próximos capítulos.

1. Introdução

A farmacognosia ou biologia farmacêutica tem como objetivo principal o conhecimento das matérias-primas vegetais de importância terapêutica. Assim, inspirados pelo grande número de substâncias com atividades farmacológicas obtidas de produtos naturais e embasados na medicina popular, a busca por novos componentes bioativos é o cerne de muitos grupos de pesquisas (Simões et al., 2004; Newman & Cragg, 2016).

Uma das principais ferramentas da química medicinal moderna é o chamado *screening* (Yunes & Cechinel, 2012). Nessa estratégia, frações, compostos ou substâncias – naturais, derivadas ou sintéticas – são aplicadas em uma plataforma que avalia um determinado tipo de atividade biológica selecionando amostras de potencial interesse. O desenvolvimento do método de triagem biológica ou *High Throughput Screening* viabilizou a avaliação de centenas de milhares de substâncias, possibilitando a descoberta de novos produtos bioativos (Geromichalos et al., 2016).

Um dos pioneiros no desenvolvimento de plataformas de *screening* é o *Nacional Cancer Institute* (NCI) nos Estados Unidos, que conta com um programa de triagem em larga escala utilizando diversas linhagens tumorais, o NCI-60. Por isso, a triagem inicial das frações obtidas de *Croton campestris* foi realizada baseada nessa metodologia, porém em escala menor, utilizando 10 linhagens de células tumorais humanas e uma linhagem normal (Rubinstein et al., 1990; Monks et al., 1991).

Após a seleção das amostras ativas *in vitro* foi necessário verificar sua efetividade *in vivo*, para que os estudos direcionados para a avaliação de seu mecanismo de ação pudessem transcorrer com embasamento de sua ação mesmo após metabolização. Por isso foram utilizados modelos experimentais murinos para o estudo das atividades antitumoral e anti-inflamatória.

O tumor sólido de Ehrlich, desenvolvido em 1896 e publicado por Paul Ehrlich em 1906, é um dos modelos melhor estabelecidos sendo muito utilizado para a triagem pré-clínica de novos agentes anticâncer. Trata-se de um tumor murino originário de adenocarcinoma de mama, que é inoculado numa densidade específica levando à geração de um tumor palpável (Matsuzak, 2004; Salgado et al., 2016). O animal tem a evolução tumoral acompanhada, características clínicas observadas ao longo do ensaio e, portanto, a verificação da efetividade sistêmica antitumoral da substância teste.

Já modelos de avaliação de atividade anti-inflamatória podem utilizar substâncias que, quando entram no organismo vivo, não são reconhecidas como próprias ou são irritativas,

levando à uma reação imunológica inespecífica naquele tecido (Morris et al., 2003; Ekambaram et al., 2017). Assim, esse tipo de ensaio permite avaliar a contribuição de mediadores envolvidos no processo inflamatório. Além disso, especialmente em modelos que envolvem a contagem de células da linhagem leucocítica, como a peritonite, por exemplo, é possível determinar a influência do tratamento na inibição da resposta imunológica celular (Vendramini-Costa et al., 2010; Iwamoto et al., 2015).

Neste contexto, a investigação da atividade antitumoral e anti-inflamatória em experimentos preliminares, bem como o estudo da melhor estratégia para obter frações ativas de *Croton campestris* A.St.-Hil., colocam-se como passos importantes para o melhor conhecimento da espécie que surge como uma candidata à fonte de novos componentes bioativos.

2. Objetivo

O principal objetivo desse estudo foi a obtenção de frações ativas a partir do extrato bruto por acetato de etila (EBA) de *Croton campestris* A.St-Hil. e a avaliação de sua atividade antiproliferativa e anti-inflamatória *in vivo* e *in vitro*.

2.1. Objetivos específicos

- Definir a estratégia de purificação para concentrar e identificar os componentes bioativos do EBA das folhas de *Croton campestris* A.St-Hil. utilizando técnicas fitoquímicas para enriquecimento das frações ativas;
- Seleção das frações com melhor perfil antiproliferativo através de biomonitoramentos em painel de linhagens tumorais representativas de diferentes tecidos humanos.
- Aplicar as frações selecionadas em modelos experimentais de tumor sólido como triagem inicial de sua atividade antiproliferativa *in vivo*, também baseando a escolha da fração alvo nos resultados prévios obtidos na dissertação de Mestrado (Monteiro, 2012);
- Avaliar a atividade anti-inflamatória em modelos murinos de inflamação tópica ou sistêmica;
- A partir da observação dos resultados, embasar a continuidade dos trabalhos farmacológicos com a espécie, objetivando o estudo de seu mecanismo de ação.

3. Material e métodos

3.1. Material vegetal

As folhas de *Croton campestris* A.St.-Hil. foram coletadas em duas etapas. A primeira, no campo da EMBRAPA no município de Maracanaú-CE em maio de 2012 para obtenção das partes aéreas para o início do projeto e obtenção de mudas para o plantio no campo experimental do Centro de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas (CPQBA). Na segunda etapa, pós-cultivo e desenvolvimento das mudas, a coleta foi realizada no campo experimental do CPQBA/UNICAMP (-22,787753,-47,111908) entre os períodos de janeiro de 2013 a maio de 2014. A exsicata referente à espécie apresenta número CPQBA16 e todo o trabalho de preparo, plantio, coleta e identificação foi feito com supervisão da Prof.^a Dr.^a Glyn Mara Figueira da Divisão de Agrotecnologia do CPQBA/UNICAMP. O acesso ao patrimônio genético foi autorizado pelo CGEN sob número processual 010358/2014-5.

O material vegetal coletado foi imediatamente submetido à secagem em estufa ventilada (Precision, Modelo 28) a 40°C por 60 horas, moído em moinho de facas com peneira de 40 mesh (MR-Manesco Ranieri LTDA, tipo MM R-320) e armazenado a -4°C até que fosse processado para a obtenção dos extratos.

3.2. Processamento fitoquímico

A obtenção dos extratos e os fracionamentos foram realizados na Divisão de Química de Produtos Naturais do CPQBA, sob orientação da Dra. Mary Ann Foglio. Todos os processos de extração foram monitorados por cromatografia de camada delgada (CCD) com diferentes fases móveis e a seleção dos componentes ativos foi embasada por biomonitoramento em testes de atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais. Com o objetivo de obter a purificação das frações, diversas estratégias de fracionamentos cromatográficos foram utilizadas com diferentes sistemas de solventes, diferentes proporções entre amostras e fases estacionárias, tais como sílica comum, sílica flash, Florisil[®], fase reversa (C18) e cromatografia em camada delgada preparativa. De acordo como as inúmeras técnicas aplicadas, as características de interação das amostras com as fases estacionárias e os resultados obtidos, optou-se pelas técnicas de cromatografia e coluna filtrantes, cromatografia clássica utilizando sílica *flash* e a técnica de remoção de graxas por partição líquido-líquido. Direcionando as metodologias de fracionamento e purificação pautadas no perfil cromatográfico da fração ativa CFqb14 do estudo anterior, foram obtidas frações mais limpas e com perfil semelhante. As frações selecionadas de *Croton campestris* foram aplicadas aos testes de atividade

farmacológica. Portanto, a seguir serão descritos apenas os métodos utilizados para a obtenção das frações que foram aplicadas nos ensaios biológicos bem como a metodologia para a sua caracterização.

3.2.1. Obtenção do extrato bruto

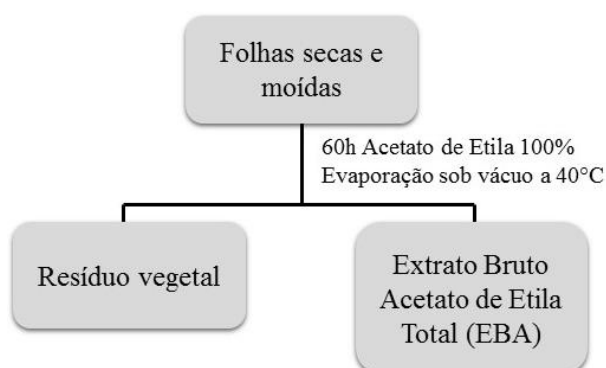
As folhas secas de *C. campestris* foram extraídas em sistema Soxhlet (Fig. 1) usando acetato de etila 100% (Sinth[®]).

Figura 1. Foto ilustrativa da extração por sistema Soxhlet.



O solvente orgânico foi eliminado utilizando vácuo em evaporador rotativo (Büchi, modelo R 200) a 40°C, obtendo-se o extrato bruto por acetato de etila (EBA) (Fig.2). Foram monitoradas as porcentagens de rendimento das extrações e também o perfil cromatográfico por cromatografia em camada delgada.

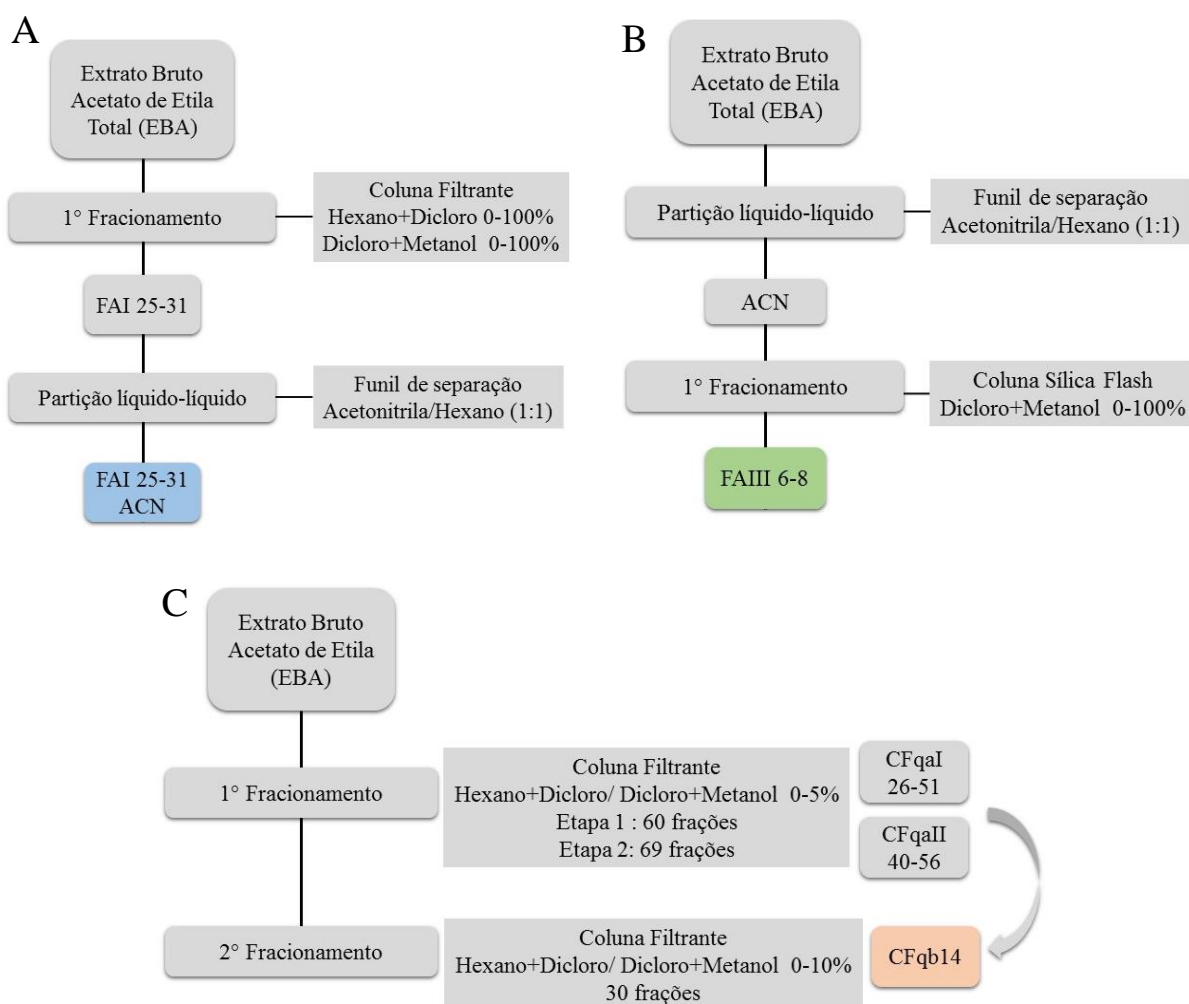
Figura 2. Fluxograma da extração total por acetato de etila em sistema soxhlet.



3.2.2. Fracionamentos

Os fracionamentos foram realizados direcionando a purificação para a obtenção de frações limpas e com princípios ativos concentrados, para monitorar sua atividade através de testes antiproliferativos e propiciar sua identificação. Assim, os fluxogramas a seguir resumem as metodologias empregadas na obtenção das frações ativas que efetivamente foram utilizadas nos testes farmacológicos (CF1b14, FAI25-31 ACN e FAIII6-8) (Fig. 3).

Figura 3. Fluxograma ilustrando as etapas da obtenção das amostras FAI25-31 ACN (A), FAIII6-8 (B) e CFqb14 de acordo com Monteiro, 2012 (C) a partir do EBA das partes aéreas de *Croton campestris*.



A cada fracionamento, o solvente orgânico das frações resultantes foi eliminado com vácuo em evaporador rotativo (Büchi, modelo R 200) a 40°C. As frações foram

monitoradas quanto à porcentagem de rendimento e ao perfil cromatográfico, que foi utilizado para eleger as frações a serem avaliadas no teste antiproliferativo.

3.2.2.1. Fracionamento em coluna cromatográfica filtrante

Nesse tipo de fracionamento a sílica é adicionada em um funil de placa porosa, sendo que a proporção sílica:amostra é variável de acordo com o tipo de amostra e objetivo do fracionamento. Para a obtenção das frações ativas foram utilizados 8,4 g de EBA e a proporção de sílica/amostra utilizada foi de 1:25 (Merck®). Como fase móvel foi empregado gradiente crescente de polaridade da combinação dos solventes hexano, diclorometano e metanol (Sinth®). As frações foram coletadas visando a inicial separação dos componentes do EBA bruto analisado, com remoção de graxas e outras substâncias farmacologicamente desinteressantes.

3.2.2.2. Fracionamento em coluna cromatográfica clássica flash

A cromatografia *flash* difere da cromatografia convencional em dois principais aspectos. Primeiramente, a sílica *flash* apresenta-se em partículas menores (250-400 mesh) e, por esse motivo, o fluxo de solvente deve ocorrer sob pressão com um fluxo de eluição de aproximadamente 7 mL/min. Esse tipo de fracionamento utiliza sílica acondicionada em uma coluna de vidro. A proporção sílica: amostra é variável, bem como a fase móvel.

Para o fracionamento da fração ACN obtida após partição do EBA foi utilizada a proporção de 1:30 de amostra/sílica partindo-se de 2,0 g de ACN. A eluição foi feita utilizando pressão e em gradiente crescente de polaridade, utilizando os solventes diclorometano e metanol.

3.2.3. Partição líquido-líquido

A mistura de dois solventes de polaridades muito distintas pode auxiliar na separação de frações com características diferentes, contribuindo para a eliminação de substâncias como graxas e outros grupos de substâncias apolares não relacionadas com a atividade obtida.

Foram utilizados 50 mL dos solventes hexano e acetonitrila 1:1 (Sinth®) para a purificação de 1,0 g de fração FAI25-31 e 1000 mL da mesma solução para a purificação de 19,0 g de EBA. Ambas as frações “acetonitrila” obtidas foram lavadas 3 vezes com hexano, 25 e 500 mL respectivamente.

3.2.4. Fração CFqb14

A fração CFqb14, que rendeu importantes resultados em estudo prévio realizado (Monteiro, 2012), teve seu perfil cromatográfico utilizado para monitorar os processos fitoquímicos de obtenção de maior quantidade de frações ativas para utilização na sequência dos estudos farmacológicos. Assim, de acordo com a metodologia descrita por Monteiro (2012), o EBA foi aplicado sobre coluna cromatográfica filtrante com fase estacionária de sílica gel 60 (Merck®) previamente empacotada, apoiada em funil de placa porosa. A coluna foi eluída com uma mistura de solventes de polaridade crescente partindo da combinação de hexano/diclorometano (0-100%) e depois com diclorometano/metanol (0-100%). Esse processo foi realizado em duas etapas (fracionamento aI e fracionamento aII).

As frações foram monitoradas e reunidas de acordo com o perfil cromatográfico apresentado, obtendo-se as frações por coluna filtrante CFqaI e CFqaII. Dentro desses dois grupos, as frações de perfil semelhante CFqaI26-51 e CFqaII40-56 foram reunidas (1,7 g) e fracionadas novamente com as mesmas fases estacionária e móvel. As frações resultantes foram monitoradas por CCD, evaporadas sob vácuo a 40°C obtendo-se as frações por coluna filtrante (CFqb). Após o biomonitoramento em painel de cultura de células, a fração CFqb14 apresentou melhor atividade e quantidade em massa para que pudesse ser utilizada nos testes farmacológicos e estudos fitoquímicos posteriores (Monteiro, 2012).

3.3. Análise por cromatografia em camada delgada (CCD)

Todos os processos de extração e fracionamento foram monitorados por cromatografia de camada delgada (CCD), na qual as amostras foram aplicadas em cromatoplasmas de Silicagel 60 F254 (Merck®) na concentração 30 mg/mL e eluídas com diclorometano/ metanol da proporção 1/10, dada a polaridade das frações ativas. Em algumas situações específicas, os eluentes utilizados foram diferentes dos citados acima e estarão designados nas legendas.

3.4. Investigação dos componentes químicos das frações ativas

3.4.1. Análise de substância isolada da fração CFqb14 por ressonância magnética nuclear (RMN)

Em parceria com o Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), foi realizado o fracionamento da fração ativa CFqb14 (Monteiro, 2012), com 57 mg dessa fração em coluna cromatográfica flash (1:90) eluída com 300 mL de

hexano:acetato de etila (80:20). A substância isolada obtida foi submetida à análise em espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear ^1H e ^{13}C AC-300 (Bruker®) dissolvida em clorofórmio deuterado.

3.4.2. Análise das frações FA25-31ACN e FAIII6-8 por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises feitas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC) aqui descritas foram realizadas em parceria com o Prof. Dr. Walter Roman da Universidade Comunitária da Região de Chapecó (UNOCHAPECÓ) de Chapecó-SC. Essas análises foram realizadas de acordo com Nour et al. (2013), com modificações, utilizando cromatógrafo Varian® Pró-Star com injetor manual (10 μL), gradiente ternário de bombas, detector UV/Vis e coluna Kromasil® ODS (5 μm) fase reversa C-18 (250 x 4,5 mm) em temperatura de 24 ± 2 °C.

Duas misturas de solventes foram utilizadas: H_2O : Ácido acético (1% v/v) (solvente A) e MeOH:Acetonitrila (90:10 v/v) (solvente B). O gradiente utilizado foi 35% de B em 5 min, 45% de B em 15 min, 65% de B em 25 min, 75% de B em 35 min, 85% de B em 45 min, 100% de B em 50 min e reestabelecendo a condição inicial em 60 min. A vazão foi de 1 mL/min e a detecção foi realizada em 254 nm. Os resultados foram comparados com padrão externo autêntico ácido gálico (Sigma-Aldrich® $\geq 99\%$, USA) (1 mg/mL), com tempos de retenção seguidos de espectro de UV.

3.4.3. Análise das frações FA25-31ACN e FAIII6-8 por espectrometria de massas de alta resolução (HRESI-MS)

A análise das frações foi realizada por espectrometria de massas (MS) com infusão direta de amostra, técnica analítica denominada *fingerprinting* ou impressão digital química (Cabral, 2010). Essa abordagem, que envolve o mínimo preparo de amostra, foi aplicada visando detectar os componentes majoritariamente presentes, comparar a constituição de diferentes extratos e relacioná-la aos efeitos observados *in vivo*. A metodologia analítica envolveu MS (Q Exactive, Thermo Scientific – Bremen, Alemanha) com fonte de ionização por electrospray (ESI). As amostras (10 mg) foram dissolvidas em 1 mL de MeOH e 10 μL desta solução foram diluídos em 990 μL de uma mistura de Metanol/ H_2O (1:1, v/v) com 0,1% de ácido fórmico (99%) para ionização no modo positivo e com 0,1 % hidróxido de amônio (25%) para ionização no modo negativo. As soluções de amostras foram injetadas por inserção direta via bomba seringa no espectrômetro de massas de configuração ESI-Obitrap (Q Exactive,

Thermo Scientific – Bremen, Alemanha). O tempo total para aquisição de cada espectro foi fixado em 1 minuto. Os espectros ESI-MS (*full scan*) foram adquiridos na faixa de m/z 150 a 1800, até um valor pouco acima do m/z do íon em estudo e com energia de colisão de 10 - 40 eV. As condições gerais de operação do equipamento foram: voltagem do spray de 3500 V, temperatura do capilar de 320 °C, pressão do *sheat gas* de 10 psi e nível de RF da S-Lens de 50 V. Os espectros foram tratados com o software Xcalibur (Thermo Scientific – Bremen, Alemanha), específico do espectrômetro de massas. As análises das amostras foram feitas no Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas do Instituto de Química da UNICAMP.

3.5. Experimentos *in vitro*

Para que apenas as frações mais ativas fossem selecionadas para a continuidade dos processos fitoquímicos de purificação, bem como para o aprofundamento dos estudos dos mecanismos de ação e investigação da atividade farmacológica *in vivo*, os experimentos *in vitro* foram uma das principais ferramentas utilizadas nesse trabalho.

3.5.1. Linhagens celulares

Para a triagem de atividade antiproliferativa *in vitro* dos extratos e frações, foram utilizadas até 10 linhagens celulares (Tab.1), oriundas de tumores humanos: linhagens K562 (leucemia), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplas drogas), UACC-62 (melanoma), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), HT29 (cólon), OVCAR-3 (ovário), 786-0 (rim) e U251 (glioma); e uma linhagem celular não tumoral HaCat (queratinócito humano). As linhagens tumorais utilizadas nesse estudo foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (NCI - Estados Unidos) e a linhagem não-tumoral foi cedida pelo Prof. Dr. Ricardo Della Coletta da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Unicamp.

Tabela 1. Linhagens celulares tumorais utilizadas no biomonitoramento *in vitro*

Sigla	Nome	Características
U251 ^a	Glioblastoma	Astrocitoma. Expressa GFAP, EGFR e vimentina ^{1,2,3} .
MCF-7 ^a	Adenocarcinoma de mama	Produce proteínas insulina like (liga fatores de crescimento), expressa receptores de estrogênio, superexpressa gene P2P-R, expressa o oncogene WNT7B, TNF- α inibe seu crescimento ^{1,4} .
NCI-ADR/RES ^b	Adenocarcinoma de ovário resistente a multidroga	Perdeu o receptor de estrogênio; expressa altos níveis do gene resistência multidroga (MDR1) traduzindo para glicoproteína-P que confere essa capacidade; proto-oncogene Raf-1 pode estar envolvido na regulação da resistência a drogas ^{1,5} .
OVCAR-3 ^b	Adenocarcinoma de ovário	Possui receptores de estrogênio, andrógeno e progesterona; adequada em estudos de câncer ovariano e avaliação da terapia hormonal ¹ .
PC-3 ^b	Adenocarcinoma de próstata	Andrógeno-independente. Baixa atividade de fosfatase ácida e 5- α redutase; sem cromossomo Y normal detectado; é uma das 3 linhagens clássicas de tumores prostáticos ^{1,6} .
786-0 ^b	Adenocarcinoma de rim	Produce peptídeo semelhante em forma e ação ao hormônio paratireoideano; mutações no gene HVL e da prolina oxidase propiciam a formação do tumor ^{1,7} .
K-562 ^c	Leucemia mielóide crônica	Linhagem altamente indiferenciada (blastos multipotentes) que podem se diferenciar em progenitores das séries eritrocítica, granulocítica e monocítica ⁸ .
UACC-62 ^{**a}	Melanoma	Originária de melanócitos, possuem várias alterações cromossômicas e não apresentam receptores de estrogênos e progesterona ⁹ .
HT-29 ^d	Adenocarcinoma col-retal	Possui microvilos, microfilamentos, mitocôndrias vacuolizadas e densas, alta expressão receptores de uroquinase, mutações pró-tumorais no gene APC (adenomatous polyposis coli) e COX-2. Expressa c-myc, K-ras, H-ras, N-ras, Myb, sis e fos concogenes ¹ .
NCI-H460 ^d	Adenocarcinoma de pulmão tipo não pequenas células	Expressa níveis de p53 comparáveis ao tecido pulmonar normal e exibe diversas anomalias estruturais em seu DNA. Expressa altos níveis COX-2 que se associam ao fenótipo invasivo e metastático; com características de células endócrinas pulmonares altamente diferenciadas; é deficiente em fator-1 de ativação da protease do citocromo c apoptótico ^{1,10} .
HaCat ^a	Queratinócito	Esponaneamente imortalizada, essa linhagem de queratinócito humano normal tem sido amplamente utilizada em estudos biológicos ¹¹ .

Tecido de Origem: ^aEctoderme; ^bMesoderme; ^cMesênquima; ^dEndoderme. Todas as células são aderidas, exceto a K-562*, que é em suspensão. Todas as linhagens apresentam morfologia epitelial, à exceção da K-562* (morfologia linfoblástica) e UACC-62** (morfologia fibroblástica). ¹ATCC, 2016; ²Bigner et al., 1981; ³Nistér et al., 1991; ⁴Huguet et al., 1994; ⁴NCI, 2016; ⁵Hamilton et al., 1984; ⁶Pisolato et al., 2016; ⁷Jiang et al., 2003; ⁸Lozzio et al., 1981; ⁹Melzer et al., 1991; ¹⁰Takahashi et al., 1989; ¹¹Wilson, 2014. Adaptado de Marchetti, 2012.

3.5.2. Biomonitoramento da atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais humanas

De acordo com as respectivas densidades de inoculação (Tab. 2), 100 μ L de suspensão celular foram inoculados em placas de 96 compartimentos, utilizando meio RPMI com 5% de SFB e penicilina-estreptomicina (2 mg/L) por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Sendo apenas uma linhagem celular por placa, foi possível avaliar cinco amostras diferentes em triplicata em cada placa. Também foi utilizada a placa de controle celular no tempo zero (T₀), que continha as diferentes linhagens celulares utilizadas no experimento e nenhum tratamento. Essa placa indica a quantidade de células nas placas 24 horas após o plaqueamento, ou seja, o quanto as células cresceram antes de receberem qualquer tratamento. Esse dado é importante para os cálculos dos parâmetros que avaliam a atividade citocida/citostática das substâncias testadas.

Tabela 2. Linhagens celulares tumorais humanas e normal (HaCat) utilizadas nos ensaios de atividade antiproliferativa *in vitro* e suas densidades de inoculação (DI).

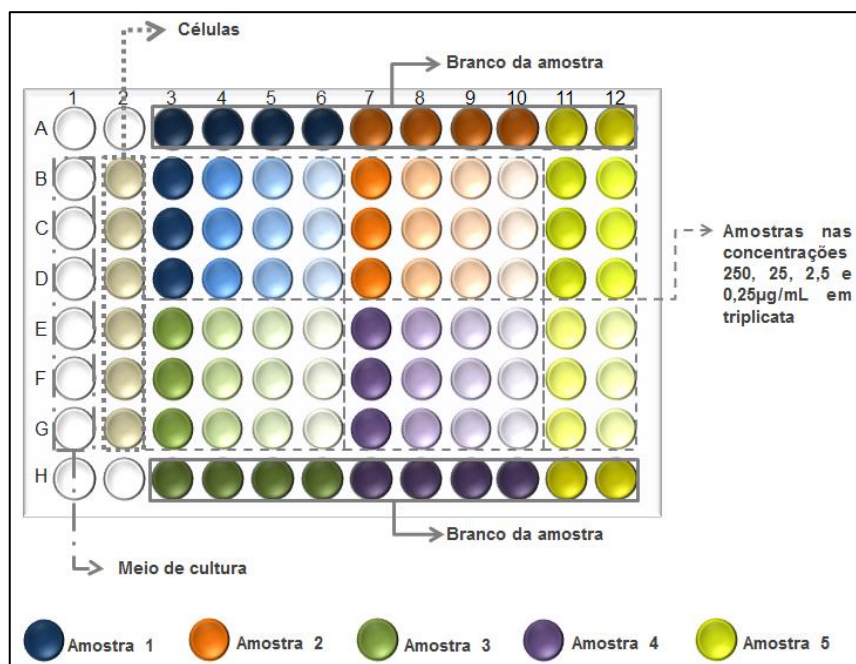
Linhagem Celular	Nome	DI (x10 ⁴ células/mL)
Glia	U251	5,0
Melanoma	UACC-62	5,0
Mama	MCF-7	6,0
Ovário com Fenótipo Resistência	NCI-ADR/ RES	5,0
Renal	786-O	4,5
Pulmão	NCI-H460	4,0
Próstata	PC-3	5,0
Ovário	OVCAR-3	7,0
Cólon	HT-29	4,0
Leucemia	K-562	4,0
Queratinócito humano	HaCat	4,0

De acordo com o princípio de biomonitoramento, todos os extratos e as frações de interesse foram submetidos ao teste antiproliferativo e apenas os que se mostraram ativos foram selecionados para a continuidade da purificação e outros testes farmacológicos.

As amostras testadas foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck®) na concentração de 0,1 g/mL. Durante o processo de diluição das amostras aplicadas nas placas experimentais, o DMSO foi diluído em pelo menos 400 vezes em RPMI com 5% de SFB e penicilina-estreptomicina (2 mg/L), sem risco de citotoxicidade. Após a diluição seriada, 100 μ L de meio contendo a amostra teste foram adicionados à placa de 96 compartimentos contendo a linhagem tumoral previamente inoculada. Foram utilizadas as concentrações de 0,25; 2,5; 25

e 250 $\mu\text{g/mL}$ em triplicata (Fig. 4) e as placas foram incubadas por 48 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 e ambiente úmido.

Figura 4. Placa de 96 poços usada nos testes antiproliferativos mostrando a disposição e concentrações das amostras, o branco das amostras, das células e do meio de cultura (Monteiro, 2012).



Assim que as placas experimentais foram tratadas, a placa T_0 foi fixada com a adição de 50 μL de ácido tricloroacético (TCA) 50% (Sigma[®]), estabelecendo a real quantidade de células presentes no momento em que as amostras foram aplicadas. Após o tempo de tratamento, ou seja, 48 horas, as células foram fixadas pela adição de 50 μL de TCA a 50%, e incubação por 1 hora a 4°C. A seguir, as placas foram lavadas 4 vezes em água corrente para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários.

Após a secagem das placas, foram adicionados 50 μL por poço do corante proteico sulforrodamina B (SRB) (Sigma[®]) a 0,4% dissolvido em ácido acético a 1%. Após serem incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos, as placas foram lavadas com solução de ácido acético 1% até a completa remoção dos resíduos de SRB. Posteriormente à secagem das placas, foi feita a adição de 150 μL de Trizma Base na concentração 10 μM e pH 10,5 (Sigma[®]) a fim de solubilizar o corante ligado às proteínas. As placas foram lidas em leitor de microplacas a 540 nm (Molecular Devices[®], modelo VersaMax). A sulforrodamina B liga-se aos aminoácidos básicos das proteínas das células viáveis no momento da fixação e então, quanto

maior a quantidade de SRB ligada ao compartimento, menor a atividade citotóxica da amostra em teste (Skehan et al., 1990; Rubinstein et al., 1990; Monks et al., 1991; Vichai & Kirtikara, 2006).

As médias dos dados obtidos pela leitura espectrofotométrica foram calculadas descontando o valor de seus respectivos brancos e através das fórmulas a seguir, foi determinada a inibição de crescimento (IC) de cada amostra testada.

Se $T > C$ a droga estimulou o crescimento, não apresentou IC.

Se $T \geq T_0$ e $< C$, a droga foi citostática e a fórmula utilizada foi $100 \times [(T - T_0) / (C - T_0)]$.

Se $T < T_0$ a droga foi citocida e a fórmula utilizada foi $100 \times [(T - T_0) / (T_0)]$.

Sendo T a média da absorbância da célula tratada, C o controle de célula e T_0 o controle das células no dia da adição das drogas, o resultado obtido foi subtraído de 100%, obtendo-se então a porcentagem de crescimento. Os dados de absorbância foram compilados na elaboração de gráficos que correlacionam a porcentagem de inibição ou morte celular com a concentração da substância testada. Cada resultado foi analisado com relação à atividade da amostra, atividade concentração dependente ou independente e seletividade para os tipos celulares.

Utilizando as médias da porcentagem de crescimento, com auxílio do *software* Origin®, foi feita regressão sigmoide das curvas obtidas e foram calculados os valores TGI (*total growth inhibition*) que são os valores da concentração necessária de amostra para inibir totalmente o crescimento celular, dado calculado para amostras com perfil citocida. Por conta das características citostáticas dos extratos e frações testadas, foram também calculados os valores de GI₅₀ (*50% of growth inhibition*) que são os valores da concentração necessária para inibir a proliferação celular em 50%. O GI₅₀ representa de forma mais adequada os resultados antiproliferativos de amostras com essas características de inibição de crescimento celular. Esses parâmetros foram utilizados para comparar a potência das amostras e evidenciar a seletividade.

3.6. Experimentos *in vivo*

Os experimentos *in vivo* são de indiscutível importância no campo científico. De aplicação extremamente ampla, eles permitem a obtenção tanto de informações refinadas e específicas quanto de dados preliminares, como é o caso da triagem de novas substâncias por biomonitoramento. Infelizmente, para estudos mais aprofundados ainda não dispomos de um eficiente modelo alternativo ao uso de animais. A busca por métodos que descontinuem o uso de cobaias vem se expandindo muito, porém, especialmente na avaliação de novas substâncias

bioativas, os experimentos *in vivo* são necessários, por fornecerem informações sobre a farmacocinética e farmacodinâmica da amostra em estudo. Por isso, nesse tipo de experimento, os animais são ferramentas nobres utilizadas para mimetizar aspectos de uma condição ou patologia humana, ou mesmo animal. Portanto, um estudo utilizando a combinação de modelos *in vivo* e *in vitro* é importante para uma conclusão sólida a respeito do potencial anticâncer de uma nova substância (Smith et al., 2005; Hajar 2011).

3.6.1. Animais

Nos diferentes experimentos realizados foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem *Swiss* para os testes de toxicidade (n de até 5 animais por grupo) e Balb C para a avaliação de atividade anticâncer e anti-inflamatória (n de até 8 animais por grupo), animais estes obtidos do CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica-UNICAMP). Foram mantidos em gaiolas com até 5 animais cada no biotério do CPQBA, com ração e água fornecidos *ad libitum*, quando o jejum não foi necessário. Os protocolos de número 2280-1 (toxicidade aguda), 2281-1 (modelo de tumor sólido), 2740-1 (edema de pata), 3622-1 (peritonite), 3721-1 (edema de orelha) foram aprovados pela Comissão de Ética e Uso Animal (CEUA) do Instituto de Biologia da UNICAMP (IB-UNICAMP).

3.6.2. Avaliação da toxicidade aguda

A fim de avaliar possíveis efeitos colaterais, toxicidade e estabelecer as doses a serem utilizadas nos testes *in vivo*, a avaliação de toxicidade aguda das frações foi baseada na OECD/OCDE - 425/2008 com algumas modificações. A sugestão protocolar estabelece como dose inicial 2000 mg/kg. No entanto, por se tratar de frações com perfil fitoquímico semelhante já estudado anteriormente, e já prevendo a perda desnecessária devido à toxicidade de altas doses, a dose inicial testada foi inferior à sugerida. Assim, camundongos *Swiss* fêmeas em grupos de até 5 animais foram tratados pela via intraperitoneal com 125, 50 e 30 mg/kg da fração FAI 25-31 ACN dissolvida em PSB de modo que o volume administrado respeitou a proporção de 10 mL/kg. A diminuição da dose foi determinada pelo que ocorreu nas 4 horas iniciais ou após 24 horas do tratamento, sendo observados os aspectos toxicológicos através de parâmetros como: estado consciente e disposição, coordenação motora e tônus muscular, reflexos, sistema nervoso central e sistema nervoso autônomo tais como alterações em locomoção (ausência de equilíbrio, tremor), comportamento (atividade reduzida, agitação), sonolência, respiração, salivação, lacrimejamento, além de cianose de extremidades e mortalidade (Lapa et al., 2008). Após 24 horas, se o animal que recebeu a dose veio a óbito,

outro animal recebeu a mesma dose para confirmar a ação tóxica. Caso o segundo indivíduo também viesse à óbito, a dose era reduzida até que ele sobrevivesse nas primeiras 24 horas. Nesse ponto, o restante do grupo recebeu a mesma dose. Os animais passaram 14 dias em observação e, quando houve, o número de animais mortos para cada uma das doses foi anotado e, com base na DL_{50} (dose letal para 50% dos animais), foi possível limitar a dose máxima e as doses experimentais a serem utilizadas.

Para a fração FAIII6-8, seguiu-se a mesma dose obtida pela avaliação de toxicidade aguda da fração FAI 25-31, uma vez que a purificação das frações ativas foi guiada para que tivessem composição qualitativa semelhante. Além disso, estudos prévios (Monteiro, 2012) já haviam definido as doses experimentais a serem utilizadas por frações semelhantes à primeira fração utilizada, que foi a CFqb14.

3.6.3. Avaliação da atividade antitumoral das frações FA25-31ACN e FAIII6-8 sobre tumor sólido de Ehrlich

Derivado de adenocarcinoma de mama murino, o tumor de Ehrlich é um tumor sólido com características agressivas e que apresenta rápido crescimento, podendo se desenvolver nas formas ascítica e sólida, dependendo do local de inoculação (Sakai et al., 2010; Calixto-Campos et al., 2013). Para avaliação inicial de atividade antitumoral *in vivo* esse modelo apresentou-se como metodologia de escolha.

Inicialmente, as células de tumor ascítico de Ehrlich foram descongeladas, ressuspendidas em tampão fosfato salina (PBS) e centrifugadas por 5 minutos a 2500 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular novamente ressuspendido em PBS, em volume suficiente para que cada animal recebesse $1,0 \times 10^4$ células numa proporção em 0,5 mL (via intraperitoneal). Dois animais *Swiss* machos receberam essas células e foram considerados doadores, e após sete dias foram eutanasiados por deslocamento cervical, seu líquido ascítico foi coletado e diluído em PBS para contagem em azul de Tripán, excluindo-se células não viáveis. A solução de células foi diluída em PBS de forma que cada animal recebesse uma injeção subcutânea em seu flanco de 60 μ L contendo 5×10^6 células.

De 3 a 4 dias após a inoculação das células, animais com tumores palpáveis foram divididos aleatoriamente nos grupos controle negativo (veículo – PBS), controle positivo e grupos experimentais para início do tratamento via IP, a cada 3 dias, com as frações ativas indicadas na tabela 4. Ao final de 10 ou 14 dias, de acordo com o estágio de desenvolvimento tumoral e sua agressividade, os animais foram eutanasiados, os tumores foram avaliados, órgãos

foram pesados e o hemograma do sangue total dos animais (Sysmex®, modelo pocH-100iV) foi avaliado.

Tabela 4. Doses utilizadas para o experimento de tumor sólido de Ehrlich.

Início do tratamento	Final do experimento	Grupos controle positivo	Tratamento	Doses
D4	D14	Doxorrubicina Europharma® 3 mg/kg	FA25-31ACN	2, 10 e 20 mg/kg
D4	D10	Doxorrubicina Europharma® 3 mg/kg	FAIII6-8	2,10 e 20 mg/kg

3.6.4. Atividade anti-inflamatória

3.6.4.1. Avaliação da atividade da fração CFqb14 sobre edema de pata induzido por carragenina

Para avaliar o efeito anti-inflamatório da fração CFqb14 foi utilizado o modelo de edema de pata induzido por carragenina, um polissacarídeo sulfatado obtido a partir de algas da família Rhodophyceae, que por representar um corpo estranho no organismo do animal, causa uma resposta inflamatória (Vendramini-Costa et al., 2010; Iwamoto et al., 2015)

O volume basal da pata direita traseira de camundongos *Swiss* fêmeas (n=8 por grupo) foi medido em hidropletismômetro. A seguir, os animais foram tratados pela via intraperitoneal sendo divididos nos seguintes grupos: controle negativo (veículo: PBS), controle positivo (indometacina 20 mg/Kg), grupos experimentais (CFqb14 1,25; 2,5 e 5 mg/Kg).

Após 30 minutos de tratamento, a inflamação foi induzida por injeção de 40 µL de carragenina 2,5% no coxim plantar direito dos animais e a variação de edema na pata foi determinada através da diferença entre o volume medido a cada tempo e o volume basal. Essa medição foi realizada nos tempos 1,5; 3; 4,5; 6; 24; 48; 72 e 96 horas, a fim de contemplar todas as etapas da via inflamatória em camundongos (Vendramini-Costa et al., 2010).

3.6.4.2. Avaliação da atividade da fração CFqb14 sobre peritonite induzida por carragenina

Com o objetivo de avaliar a migração leucocitária para a cavidade peritoneal foi aplicado o teste de peritonite induzida por carragenina (Iwamoto et al., 2015; Vendramini-Costa et al., 2015)

Os animais foram tratados pela via subcutânea com 5 mg/kg de CFqb14, com o veículo (PBS) e controle positivo (dexametasona 2,5 mg/kg). Após 1 hora, a peritonite foi induzida pela injeção de solução de carragenina no peritônio de cada animal (500 µg/250µL). Um grupo controle (satélite) foi inoculado intraperitonealmente com 250 µL de PBS, sendo este o grupo controle não inflamado. Depois de 4 horas, os camundongos foram eutanasiados e a cavidade intraperitoneal foi lavada com 5 mL de PBS contendo 5 IU/mL de heparina. O fluido foi recolhido e o número total de leucócitos foi analisado no equipamento hematológico Sysmex® modelo Poch-100iV.

3.6.4.2.a. Dosagem de mieloperoxidase

A enzima mieloperoxidase (MPO) é expressa exclusivamente por células da linhagem mielóide e está presente em grande concentração em neutrófilos ativados (Atwal et al., 2017). Por isso, a dosagem de MPO indica a presença de leucócitos polimorfonucleares no local da inflamação. Dessa forma, se a substância testada causar a redução da concentração dessa enzima, isso é um indicativo de redução da migração ou indução de neutrófilos no tecido acometido pela inflamação.

Para a dosagem de mieloperoxidase (MPO), 100 µL do líquido peritoneal de cada animal experimental foi diluído em 900 µL de solução contendo PBS pH 6,0 e 0.5% de hexadecil-trimetilamonio bromido (HETAB). Dessa solução, foram recolhidos 50 µL em triplicata e colocados em placa de 96 poços. A cada poço, acrescentou-se 50 µL de O-dianisidina 0,067% em solução de PBS pH 6,0 com 0,5% de HETAB e 50 µL de água oxigenada 0,003% em água deionizada e incubou-se por 5 minutos, ao abrigo da luz (Bradley et al., 1982). Para parar a reação adicionou-se 50 µL de ácido sulfúrico 4 M. A leitura foi feita por espectrofotometria, a 460 nm, sendo a quantidade de MPO caracterizada pelo aumento de absorbância das amostras, ou seja, com o aumento da atividade dessa enzima ocorre o aparecimento da cor laranja nos compartimentos (Grisham, Beniot e Granger, 1990).

3.6.4.3. Avaliação da atividade da fração FAI25-31 ACN sobre edema de orelha induzido por óleo de cróton

O óleo de cróton é extraído das sementes de *Croton tiglium* L. e é rico em 12-O-tetradecanoilphorbol-13-acetato (TPA), um éster de forbol. Usado amplamente em avaliação de atividade anti-inflamatória, essa substância irritante foi utilizada com o objetivo de avaliar o efeito anti-edematogênico da FAI25-31 ACN (Otuki et al., 2005).

Grupos de camundongos fêmeas da linhagem Balb/C (n=8/grupos), foram pesados e receberam pré-tratamento com fração FA25-31 uma hora antes do agente irritante (Óleo de Cróton – Sigma®) por duas vias de administração: tópica (TO) e intraperitoneal (IP). As doses dos tratamentos tópico foram diluídas em solução de acetona: água destilada (70:30; v:v) na proporção massa de extrato/mL, e as doses dos tratamentos intraperitoneal foram diluídas em PBS pH 7. O controle negativo recebeu o veículo (acetona 70% tópico na orelha direita ou PBS via intraperitoneal) e o controle positivo recebeu dexametasona (5 mg/Kg intraperitoneal ou 5 mg/mL TO). A concentração da fração FA 25-31 utilizada no tratamento tópico corresponde à dose utilizada via IP, ou seja, a solução utilizada para tratar os animais via IP continha 15 ou 30 mg/mL da fração. Os tratamentos estão explicados na tabela abaixo.

Tabela 5. Doses utilizadas para o experimento de edema de orelha.

Via de administração	Tratamento	Doses
Tópica	FA 25-31	15 e 30 mg/mL
Intraperitoneal	FA 25-31	10 e 20 mg/kg

Depois de uma hora do tratamento, foi administrado topicamente a suspensão de óleo de cróton (Sigma-Aldrich®, 5% v/v em acetona 70 %, 20 µL/orelha), enquanto que a orelha esquerda foi tratada apenas com o veículo (acetona 70%, 20 µL/orelha). Após 4 horas, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e fragmentos de 7 mm de diâmetro foram retirados de cada orelha e pesados. Através da diferença entre o peso dos fragmentos das duas orelhas foi avaliado o edema induzido pelo óleo de cróton, calculando-se a média de inibição para cada grupo. Após a pesagem, os fragmentos de orelhas foram armazenados em ultra freezer -80°C (Forma™ Scientific- mod. 925, EUA) para posterior dosagem de mieloperoxidase.

3.6.4.3.a. Dosagem de mieloperoxidase

Para a quantificação da mieloperoxidase (MPO), fragmentos de tecido foram retirados da orelha e diretamente colocados sobre refrigeração após adição do tampão, na relação de 100 mg de tecido para cada 1 mL de tampão (fosfato de potássio 50 mM pH 6,0 com HTAB 0,5%). As amostras foram homogeneizadas em triturador IKA (Disperser T 10 basic, Staufen, Germany) e posteriormente centrifugadas por 10 minutos 12000 rpm a 4°C. Em placa de 96 poços, pipetou-se 30µL do sobrenadante da amostra em triplicata e, em seguida, 270µL de tampão substrato (o-dianisidina 0,067% em solução de PBS pH 6,0 com 0,5% de HETAB e

50 µL de água oxigenada 0,003% em água deionizada). Em seguida, as placas foram incubadas por 5 minutos, ao abrigo da luz (Bradley et al., 1982). A reação foi paralisada com 50 µL de ácido sulfúrico 4 M e a leitura foi feita por espectrofotometria, a 460 nm.

3.7. Análise dos dados

Os softwares Origin® e GraphPad Prism 5® foram utilizados para a construção dos gráficos, sendo o segundo também utilizado para as análises estatísticas. Os resultados foram expressos da forma média \pm erro padrão. A diferença estatística entre os grupos foi avaliada por *one-way* ANOVA, seguido de teste de Tukey. Valores com p menor ou igual a 0,05 foram considerados significativos.

4. Resultados e discussão

4.1. Obtenção dos extratos brutos, frações ativas e biomonitoramento

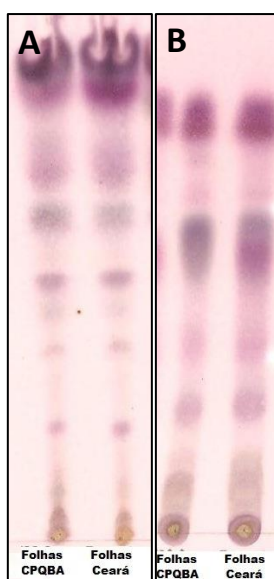
A fim de comparar o rendimento da extração, o perfil cromatográfico e a atividade antiproliferativa *in vitro* dos extratos brutos obtidos por acetato de etila (EBA) das partes aéreas coletadas no CPQBA e do material advindo de Maracanaú-CE, foram feitas extrações em paralelo.

Tabela 6. Massa e rendimento dos extratos obtidos por sistemas Soxhlet com acetato de etila.

Extrato	Massa material seco (g)	Massa obtida (g)	Rendimento (%)
EBA Ceará	350,0	22,60	6,46
EBA CPQBA	80,8	5,79	7,16

Os perfis cromatográficos demonstraram grande semelhança entre os extratos (Fig. 5), reafirmando a identidade da espécie e indicando que a composição qualitativa dos materiais estudados foi basicamente a mesma. Com relação aos rendimentos extrativos, tanto as folhas obtidas no Ceará quanto as obtidas a partir do indivíduo do CPQBA, apresentaram valores próximos (Tab. 6).

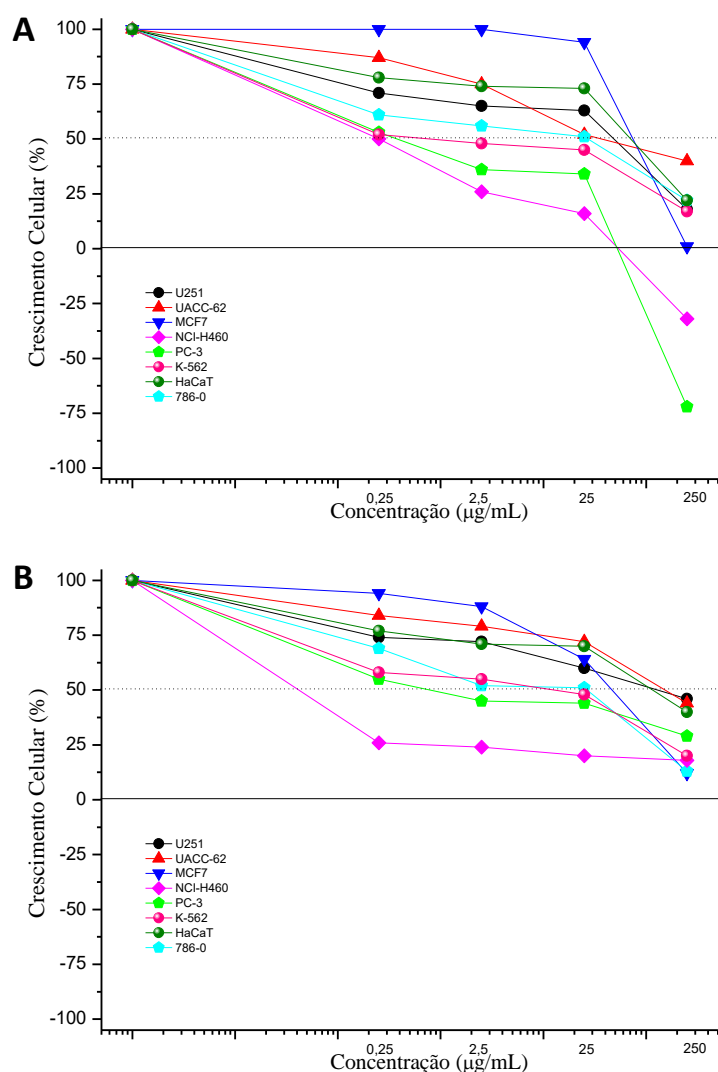
Figura 5. Perfil observado por CCD dos EBA obtido por sistema Soxhlet das folhas de *C. campestris* colatadas no CPQBA e em Maracanaú-CE.



A) Uso de diclorometano/ metanol (90/10) como fase móvel. B) Uso de diclorometano/ metanol (99/1) como fase móvel. Solução de anisaldeído como revelador.

Os dois extratos brutos foram avaliados em teste de atividade antiproliferativa e ambos mantiveram o perfil de inibição do crescimento celular observado anteriormente durante o projeto de mestrado (Monteiro, 2012), o que viabilizou a continuidade dos estudos com esse novo material vegetal.

Figura 6. Atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais e linhagem HaCat, após 48 horas de tratamento.



A) EBA de folhas secas de *C. campestris* coletadas no município de Maracanaú-CE. **B)** EBA de folhas secas de *C. campestris* coletadas no CPQBA em Paulínia-SP. Linhagens: U251 (glioma), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão tipo células não pequenas), PC-3 (próstata), K-562 (leucemia), HaCat (queratinócito humano normal).

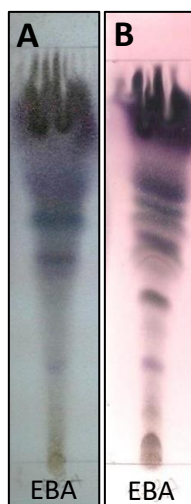
Para obtenção de maior quantidade de EBA para prosseguir com os trabalhos de isolamento e identificação estrutural dos componentes, foi necessária a realização de novas extrações utilizando o mesmo método. Os extratos obtidos tiveram seu rendimento em torno de

6% (Tab. 7), mantendo o perfil cromatográfico padrão do EBA das folhas dessa espécie (Fig. 7). O material utilizado foi o coletado no município de Maracanaú-CE e no CPQBA em Paulínia-SP.

Tabela 7. Massa e rendimento dos extratos obtidos por sistemas Soxhlet com acetato de etila.

Extrações	Massa material seco (g)	Massa obtida (g)	Rendimento (%)
Ceará 2	723,0	44,62	6,72
CPQBA 2	664,0	45,84	6,34

Figura 7. Perfil observado por CCD dos EBAs produzidos extraídos em sistema Soxhlet.



Uso de diclorometano/ metanol (90/10) como fase móvel e solução de anisaldeído como revelador.

A) Folhas de *C. campestris* colatadas em Maracanaú-CE. **B)** Folhas de *C. campestris* colatadas no CPQBA em Paulínia-SP.

Inicialmente, o processo de purificação da porção ativa seguiu a estratégia de fracionamento do EBA em coluna filtrante, utilizando sílica como fase estacionária e o processo de eluição com gradientes de solventes de polaridade crescente. Posteriormente foi empregada a metodologia para remoção das graxas por partição líquido-líquido e o fracionamento em coluna clássica utilizando sílica *flash*. As frações de interesse foram monitoradas nos testes de atividade antiproliferativa, o que propiciou o biomonitoramento do processamento fitoquímico de purificação.

Ao longo dos fracionamentos, as massas obtidas eram cada vez menores devido ao processo de purificação em si. Dessa maneira, um novo lote de EBA foi utilizado para novos

fracionamentos. Recorrendo aos resultados do mestrado (Monteiro, 2012), uma das frações ativas obtidas depois de dois fracionamentos foi a CFqb14. Por isso, um novo processo de fracionamento foi iniciado, seguindo os mesmos passos de eluição utilizados na dissertação de mestrado, para obter frações ativas com o perfil cromatográfico semelhante à fração CFqb14 (Fig. 8), a qual apresentou atividade em diferentes experimentos farmacológicos.

Figura 8. Perfil observado por CCD da fração CFqb14 obtida pelo fracionamento da fração FaI+II do EBA das partes aéreas de *C. campestris* (Monteiro, 2012).



Uso de diclorometano/ metanol (90/10) como fase móvel. Solução de anisaldeído como revelador.

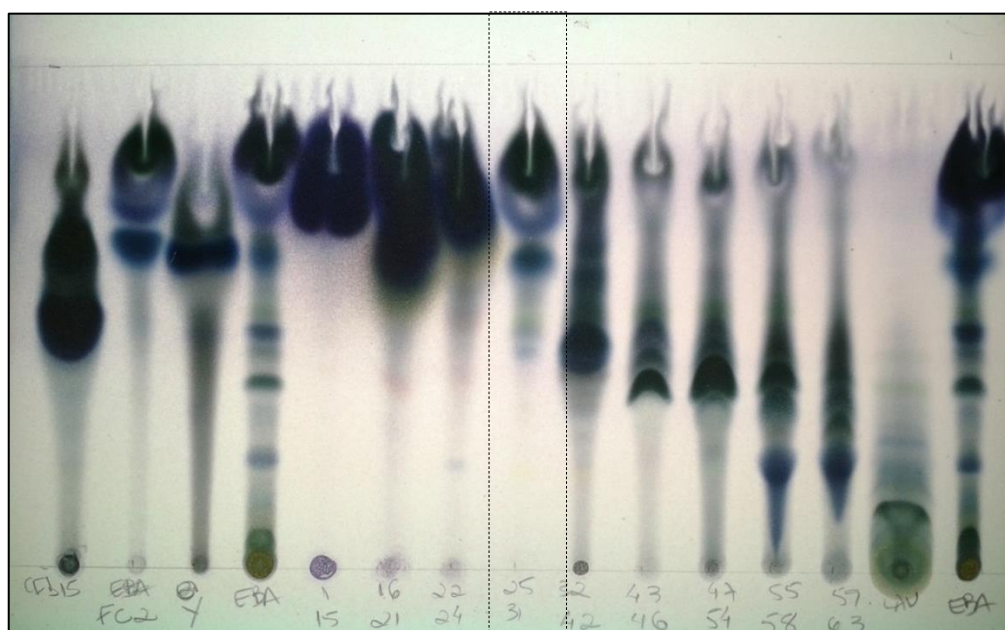
Conforme demonstrado na tabela abaixo, o fracionamento em coluna filtrante do EBA resultou em 63 frações que foram reunidas de acordo com a semelhança de seu perfil cromatográfico.

Tabela 8. Massa e rendimento das frações obtidas no fracionamento AI do EBA das partes aéreas de *Croton campestris* por coluna filtrante.

Frações	Massa obtida (g)	Rendimento (%)
1-15	1,55	18,44
16-21	0,27	3,26
22-24	0,09	1,02
25-31	2,34	27,84
32-42	0,34	4,06
43-46	0,10	1,22
47-54	0,22	2,56
55-58	0,11	1,25
59-63	0,17	1,92
LAV	1,85	21,97

Além do objetivo de obter uma fração mais pura para identificação dos componentes ativos, também se buscou uma fração com perfil semelhante à fração CFqb14 (Monteiro, 2012) para o prosseguimento dos testes *in vivo*. Por isso, comparando-se os perfis cromatográficos (Fig. 9), observando-se a atividade antiproliferativa obtida e verificando-se a quantidade de amostra obtida (Tab. 8), foi selecionada a fração FAI 25-31.

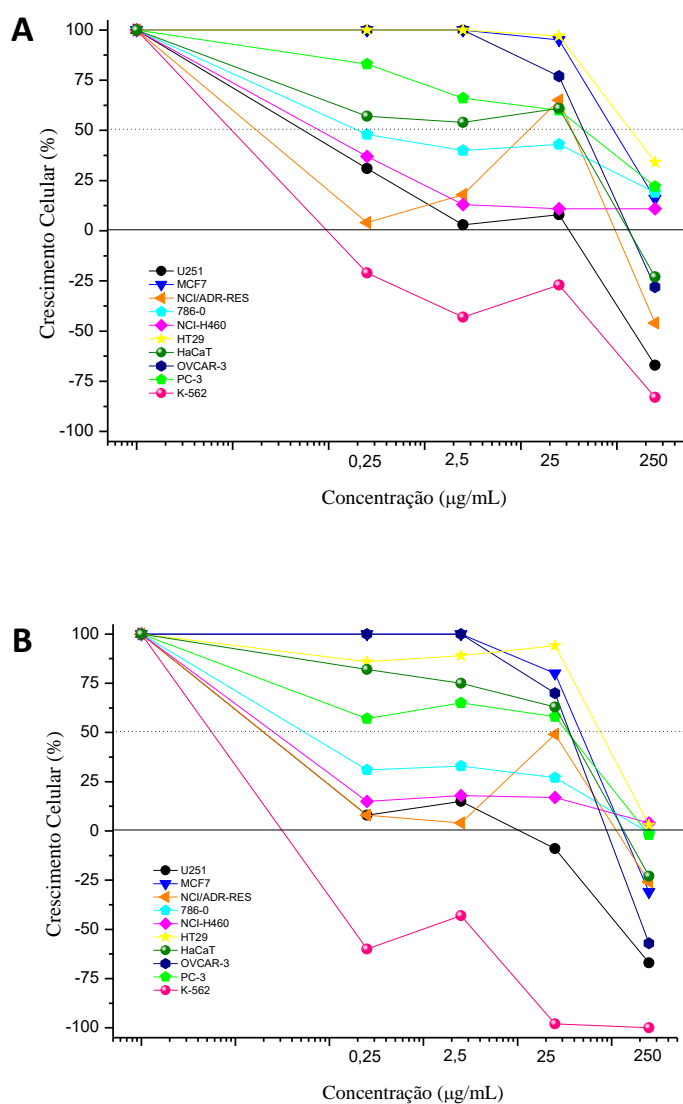
Figura 9. Perfil observado por CCD das frações obtidas pelo fracionamento AI do EBA das partes aéreas de *C. campestris* com a fração selecionada para os testes *in vivo* em destaque.

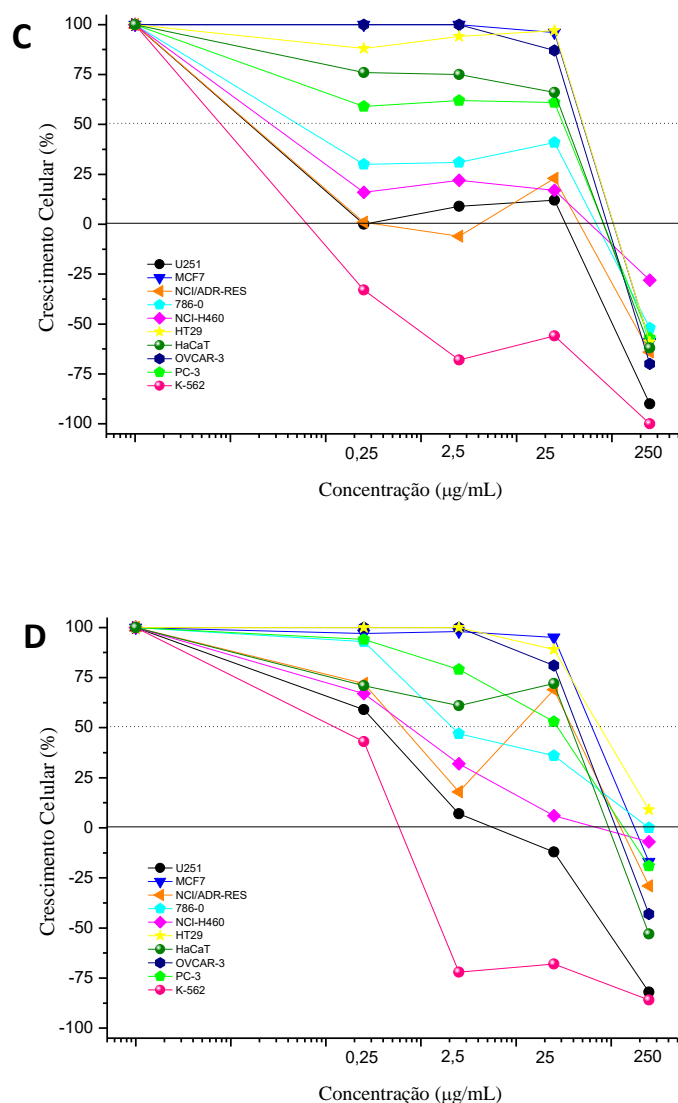


Uso de diclorometano/ metanol (90/10) como fase móvel. Solução de anisaldeído como revelador.

Fazendo um paralelo entre perfil cromatográfico e perfil de atividade antiproliferativa, podemos observar uma atividade muito semelhante entre as frações FAI 25-31, FAI 32-42 e FAI 43-46 (Fig. 10A, B e C). Acredita-se que as bandas em comum dessas frações são as responsáveis pela atividade citotóxica. Reforça-se aqui também, a inatividade dos componentes apolares, considerando que a fração FAI 43-46 apresentou atividade antiproliferativa, apesar de apresentar concentração bastante reduzida desses componentes (Fig. 10C). Já na fração FAI 59-63 (Fig. 10D), ocorreu a redução da presença de princípios ativos, comprovado pela redução da atividade da amostra.

Figura 10. Atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais e linhagem HaCat, após tratamento de 48 horas com frações do Fracionamento AI obtidas por coluna cromatográfica clássica do EBA das partes aéreas de *C. campestris*.





A) FAI25-31. **B)** FAI32-42. **C)** FAI43-46. **D)** FAI59-63. Linhagens: U251 (glioma), NCI/ADR-RES (ovário resistente à múltiplas drogas), MCF-7 (mama), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão tipo células não pequenas), PC-3 (próstata), OVCAR-03 (ovário), HT-29 (cólon), K-562 (leucemia), HaCaT (queratinócito humano normal).

A tabela 8 mostra os valores de GI_{50} , ou seja, concentração da amostra que inibe o crescimento celular em 50%. Dessa maneira, comparando a atividade das amostras frente ao painel de células, observamos a marcada seletividade para as linhagens tumorais de pulmão (NCI-H460) e rim (786-0), já observada anteriormente para o EBA e frações (Monteiro, 2012). Além disso, outras linhagens apresentaram-se sensíveis aos tratamentos, como U251 (glioma), NCI/ADR-RES (ovário) e leucemia (K562).

Tabela 8. Valores de GI₅₀ (µg/mL) das frações do Fracionamento AI do EBA das partes aéreas de *C. campestris*.

GI ₅₀	U251	MCF7	NCI/ADR-		NCI-		PC-3	OVCAR-3	HT29	K-562	HaCat
			RES	786-0	H460						
FA 25-31	<0,25	109,06	<0,25	0,25	<0,25		23,92	28,98	172,87	<0,25	2,51
FA 32-42	<0,25	29,55	<0,25	<0,25	<0,25		5,05	27,70	69,21	<0,25	26,76
FA 43-46	<0,25	34,91	<0,25	<0,25	<0,25		26,57	31,14	35,73	0,68	27,12
FA 59-63	9,97	33,68	1,23	4,14	0,74		25,40	29,67	74,59	<0,25	28,09

Devido ao perfil de atividade, à quantidade de amostra obtida e ao perfil cromatográfico comparável à fração CFqb14 (Monteiro, 2012), a fração FAI25-31 foi submetida ao procedimento de partição líquido-líquido para que sua porção apolar desinteressante fosse removida.

A retirada de substâncias graxosas previamente realizada no EBA mostrou que a fração hexânica (apolar) resultante do processo não apresentava atividade antiproliferativa relevante. Por outro lado, a fração acetonitrila, ou seja, a fração mais polar, pareceu concentrar os princípios ativos envolvidos na atividade citotóxica. Por isso, essa metodologia foi utilizada para purificação inicial do EBA e também para amostras como a FAI25-31 que, apesar de apresentar um perfil cromatográfico interessante quando comparada a outras amostras previamente preparadas, ainda continha muitos componentes como graxas e pigmentos. O rendimento foi muito satisfatório (Tab. 9) e também foi possível observar que a fase apolar eliminou muitos dos componentes não relacionados à atividade antiproliferativa (Fig. 12).

Tabela 9. Rendimento da purificação por partição líquido-líquido (Acetonitrila/Hexano 1:1) da fração FAI25-31 do EBA de partes aéreas de *Croton campestris*.

Frações	Massa obtida (g)	Rendimento (%)
FAI 25-31 ACN	0,325	32,27
Hexano	0,650	64,55

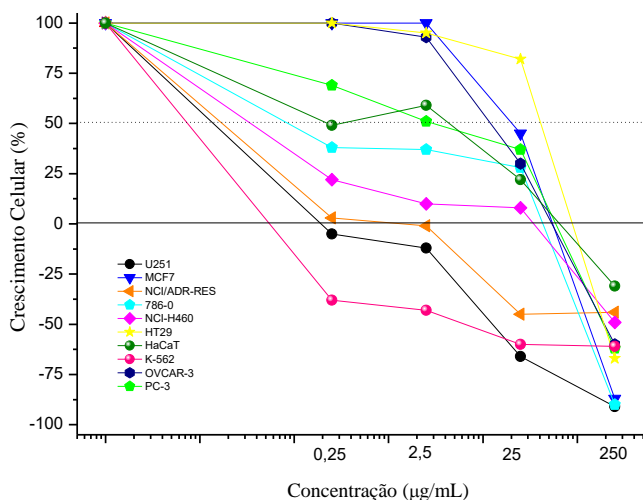
Figura 11. Perfil observado por CCD das frações obtidas após partição líquido-líquido (Acetonitrila/Hexano 1:1) da fração FA25-31 do EBA de partes aéreas de *Croton campestris*.



Uso de diclorometano/ metanol (90/10) como fase móvel. Solução de anisaldeído como revelador.

Comparativamente ao gráfico da atividade antiproliferativa da fração FAI25-31 sem purificação por acetonitrila (Fig. 10A), a atividade antiproliferativa da fração acetonitrila (FAI25-31) foi mais potente, especialmente para a concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 12). Além de apresentar seletividade para as linhagens tumorais NCI-H460 e 786-0 também mostrou elevado efeito citotóxico para as linhagens U251, NCI-ADR-RES e K562, confirmando o aumento da sua potência (Tab. 10). Outro benefício dessa técnica foi o enriquecimento da fração ativa, já que retirou componentes apolares desinteressantes que correspondem a quase 70% da constituição da amostra, sem que a mesma perdesse sua atividade.

Figura 12. Atividade antiproliferativa após tratamento de 48 horas com a fração FAI25-31 ACN obtida através de purificação inicial por partição líquido-líquido por acetonitrila-hexano da fração FA25-31 do EBA das partes aéreas de *C. campestris* em cultura de células tumorais e linhagem HaCat.



Linhagens: U251 (glioma), NCI/ADR-RES (ovário resistente à múltiplas drogas), MCF-7 (mama), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão tipo células não pequenas), PC-3 (próstata), OVCAR-03 (ovário), HT-29 (côlon), K-562 (leucemia), HaCaT (queratinócito humano normal).

Tabela 10. Valores de GI₅₀ (µg/mL) da fração FAI25-31 ACN obtida através da purificação inicial por partição líquido-líquido por acetonitrila-hexano da fração FA25-31 do EBA de partes aéreas de *C. campestris*.

GI ₅₀	U251	MCF7	NCI/ADR-RES	786-0	NCI-H460	PC-3	OVCAR-3	HT29	K-562	HaCat
FA 25-31 ACN	<0,25	24,67	<0,25	<0,25	<0,25	1,97	22,16	29,91	<0,25	0,88

A fração FAI25-31 ACN resultante desse processo de exclusão de substâncias mais apolares foi aplicada no teste de toxicidade aguda para verificação de dose segura a ser utilizada e, posteriormente, estudos de eficácia na inibição do crescimento tumoral em modelo de tumor sólido de Ehrlich e estudos de atividade anti-inflamatória.

A fim de se obter mais massa da fração ativa com o perfil cromatográfico e de atividade antiproliferativa de FAI25-31 ACN, 19 g de um novo lote de EBA foi submetido à partição líquido-líquido e com 10,15% de rendimento, obteve-se 1,9 g de fração ACN (Tab.11).

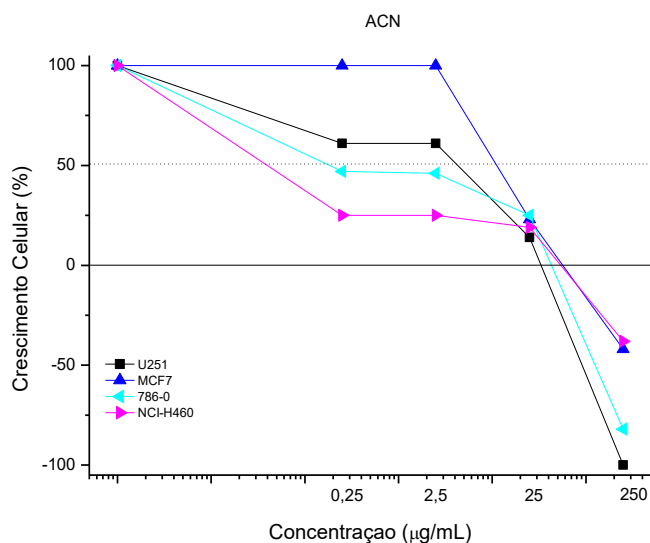
Tabela 11. Rendimento da purificação por partição líquido-líquido (Acetonitrila/Hexano 1:1) do EBA de partes aéreas de *Croton campestris*.

Frações	Massa obtida (g)	Rendimento (%)
ACN	1,93	10,15
Hexano	11,70	61,58

Figura 13. Perfil observado por CCD das frações hexânica (HEX) e acetonitrílica (ACN) obtidas após partição líquido-líquido (Acetonitrila/Hexano 1:1) do EBA de partes aéreas de *Croton campestris*. Uso de diclorometano/ metanol (90/10) como fase móvel. Solução de anisaldeído como revelador.



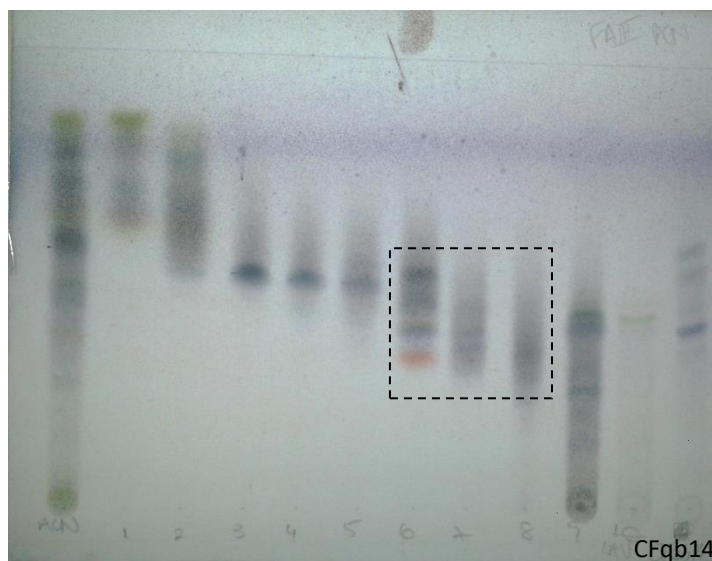
Figura 14. Atividade antiproliferativa após tratamento de 48 horas com a fração ACN obtida da purificação por partição líquido-líquido por acetonitrila-hexano do EBA das partes aéreas de *C. campestris* em cultura de células tumorais.



Linhagens: U251 (glioma), MCF-7 (mama), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão tipo células não pequenas).

Após confirmação da manutenção de sua atividade *in vitro* (Fig. 14), 3 g da fração ACN foram submetidos ao fracionamento por cromatografia clássica em sílica *flash*, quando foram obtidas 10 frações (Fig. 15), que foram reunidas de acordo com o perfil cromatográfico de interesse.

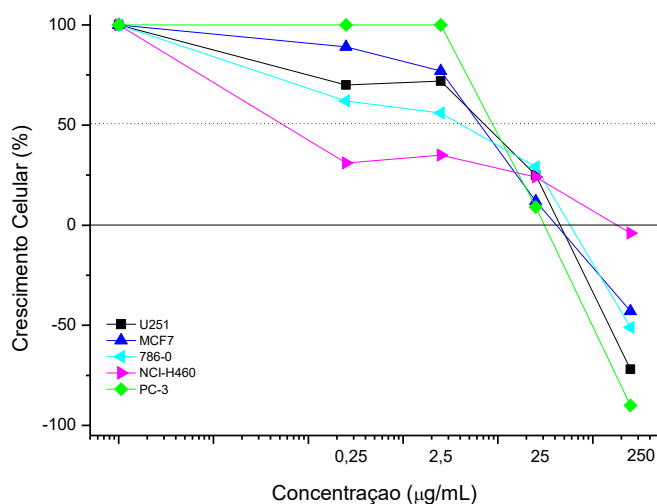
Figura 15. Perfil observado por CCD das frações obtidas após fracionamento em coluna cromatográfica flash da fração ACN de partes aéreas de *Croton campestris*.



Uso de diclorometano/ metanol (90/10) como fase móvel. Solução de anisaldeído como revelador. Destaque para os compostos de interesse baseado no perfil cromatográfico da fração CFqb14 na extrema esquerda da placa cromatográfica.

Por comparação com o perfil cromatográfico desejado, foram selecionadas as frações 6, 7 e 8, reunidas na então fração FAIII6-8, que teve sua atividade antiproliferativa testada (Figura 16). Essa fração apresentou rendimento de 13% originando 0,4 g de material.

Figura 16. Atividade antiproliferativa após tratamento de 48 horas com a fração FAIII6-8 obtida do fracionamento da fração ACN do EBA das partes aéreas de *C. campestris* em cultura de células tumorais.



Linhagens: U251 (glioma), MCF-7 (mama), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão tipo células não pequenas), PC-3 (próstata).

De acordo com o gráfico da figura 16 e com os valores de GI_{50} mostrados na tabela 12, foi possível confirmar que a fração FAIII6-8 concentrada nos componentes ativos de interesse manteve seu perfil de atividade citostática característico para as frações obtidas de *Croton campestris*. Dessa maneira, pôde-se utilizar esse material na execução das avaliações experimentais *in vivo* e *in vitro*, bem como no estudo de sua composição química.

Tabela 12. Valores de GI_{50} (µg/mL) da fração FAIII6-8 do EBA de partes aéreas de *C. campestris*.

GI_{50}	U251	MCF7	786-0	NCI-H460	PC-3
FAIII6-8	5,11	5,58	1,66	<0,25	17,77

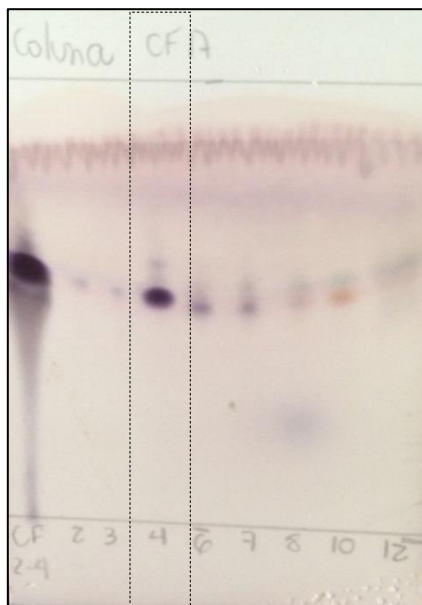
4.2. Composição das frações ativas

4.2.1. Glucosil-estigmasterol palmitato isolado da fração CFqb14

Numa parceria com o Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), alguns estudos foram feitos para isolar e identificar os componentes majoritários da fração ativa e promissora avaliada durante o mestrado, denominada CFqb14

(Monteiro, 2012). Foram obtidos 6mg do composto (Croton 1) com bom grau de pureza por CCD (Fig. 17).

Figura 17. Perfil observado por CCD do composto isolado (em destaque) de *Croton campestris* obtido por fracionamento em coluna flash. Uso de hexano/acetato de etila (80/20) como fase móvel. Solução de anisaldeído como revelador.



A amostra foi submetida à análise em espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear ^1H e ^{13}C AC-300 (Bruker®) dissolvida em clorofórmio deuterado, cujos espectros estão demonstrados nas figuras abaixo.

Figura 18. Espectro de RMN ^1H do composto em clorofórmio deuterado adquirido em equipamento AC-300 (Bruker®).

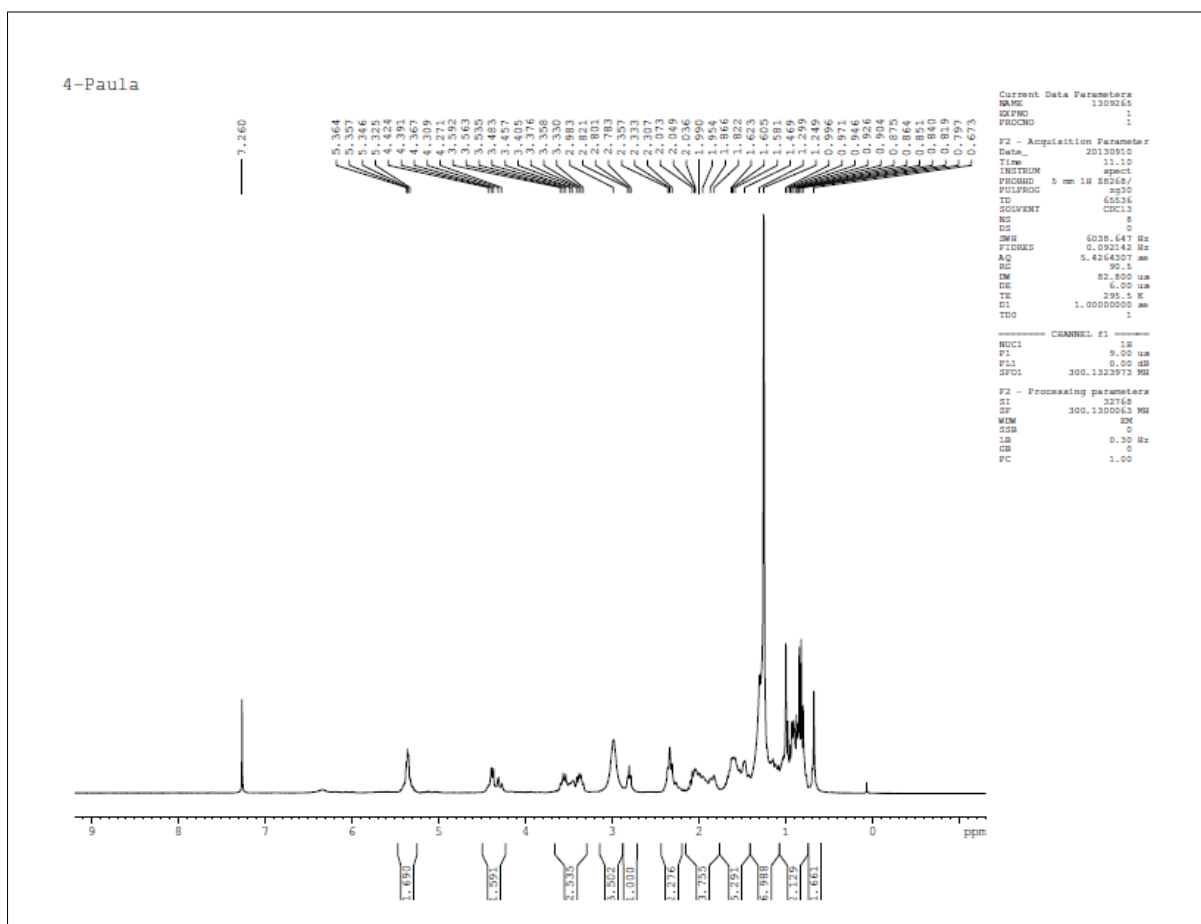
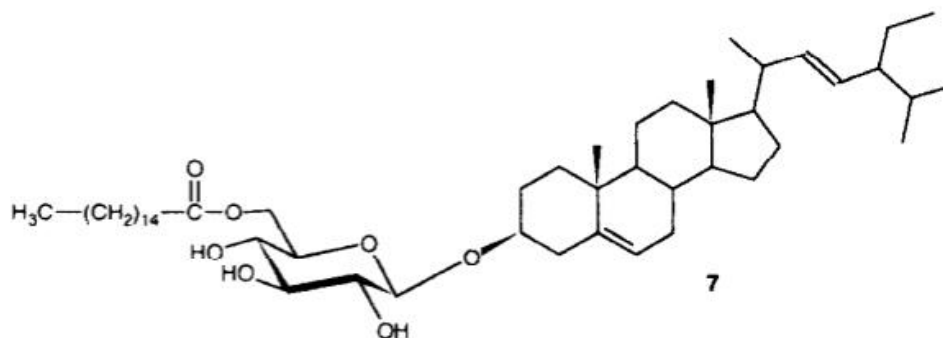
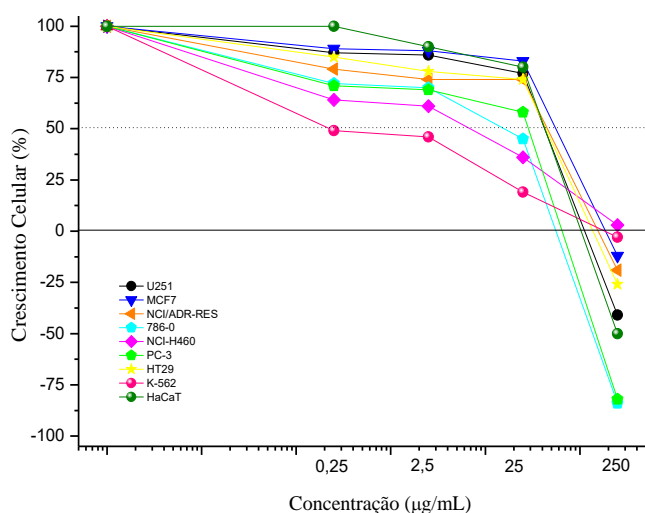


Figura 20. Estrutura do glicosil-estigmasterol palmitato

Algumas reações ainda são necessárias para confirmação da estrutura (majoritária) como a hidrólise sequencial (ácida e básica), extração dos ácidos graxos e identificá-los separadamente como ésteres metílicos, além de tentar a separação dos hidrocarbonetos (ou esteróis) da segunda hidrólise ácida.

O perfil antiproliferativo observado para esse composto manteve as características citostáticas comumente observadas para as amostras de *C. campestris*, mas sem aumento de potência. Como não houve um perfil com melhora na atividade (Fig. 21), podemos inferir que essa substância atua junto a outros compostos para conferir as atividades antiproliferativas *in vitro* e *in vivo* observadas.

Figura 21. Atividade antiproliferativa após tratamento de 48 horas com o composto mais abundante isolado da fração CFqb14, obtida por fracionamentos sequenciais de *C. campestris*, em cultura de células tumorais e linhagem HaCaT.

Linhagens: U251 (glioma), NCI/ADR-RES (ovário resistente à múltiplas drogas), MCF-7 (mama), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão tipo células não pequenas), PC-3 (próstata), HT-29 (cólon), K-562 (leucemia), HaCaT (queratinócito humano normal).

Muitos autores reportam que a potência da atividade da mistura de componentes ativos de um extrato pode ser maior do que aquela obtida por substâncias isoladas. Entretanto, os componentes responsáveis por esses resultados são identificados com dificuldade, uma vez que o sinergismo confere uma grande complexidade fitoquímica ao processo de purificação e biomonitoramento (Junio et al., 2011). Dessa maneira, o possível sinergismo presente entre os componentes das amostras avaliadas é um ponto a ser investigado.

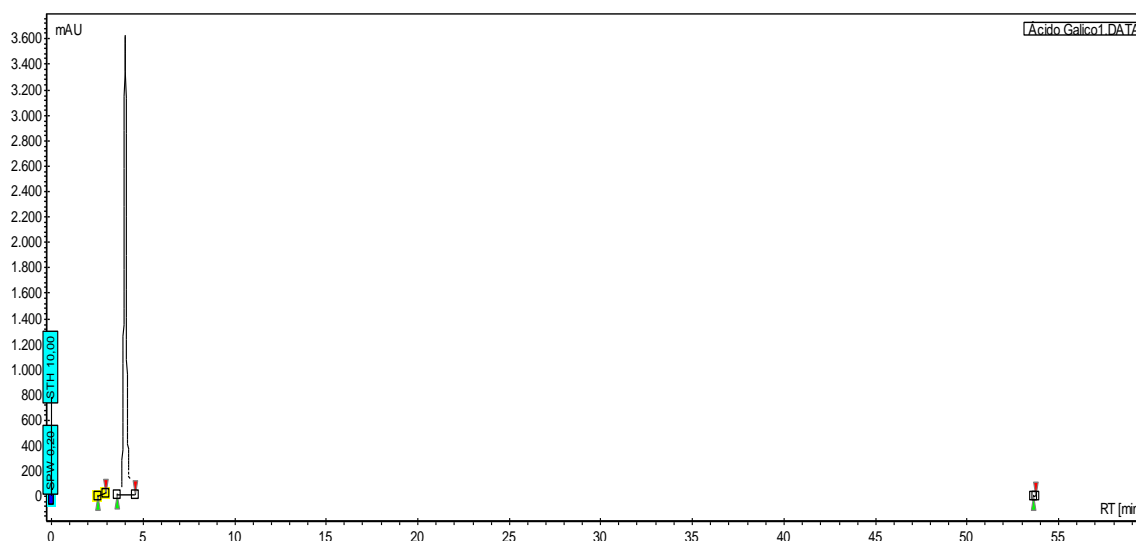
Tabela 13. Valores de GI₅₀ (µg/mL) obtidos após o tratamento utilizando o composto isolado Croton 1 de *C. campestris*.

GI ₅₀	U251	MCF7	NCI/ADR-		NCI-		HT29	K562	HaCat
			RES	786-0	H460	PC-3			
Croton 1	28,89	30,55	28,54	24,81	3,16	25,99	28,45	0,47	29,42

4.2.2. O ácido gálico é o componente majoritário das frações FAI25-31ACN e FAIII6-8

Em parceria com Prof. Dr. Walter Roman da UNOCHAPECO, foi feita uma avaliação do componente majoritário das frações FAI25-31ACN e FAIII6-8 e notou-se que o primeiro pico obtido por CLAE tinha tempo retenção conhecido e compatível com ácido gálico. Assim, utilizando um padrão dessa substância, foi obtido o cromatograma abaixo.

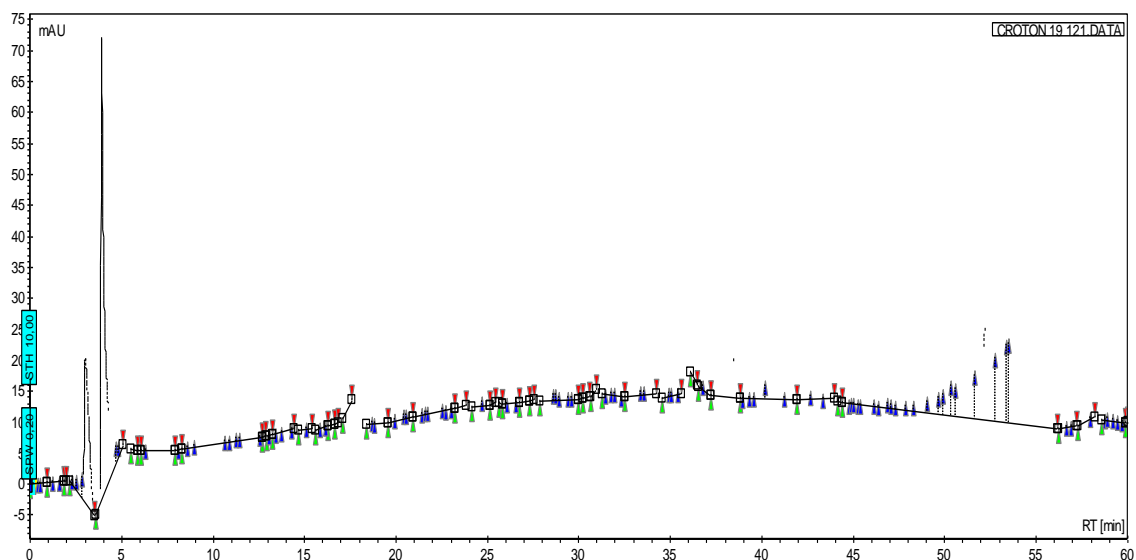
Figura 22. Cromatografia líquida de alta eficiência do padrão ácido gálico (1 mg/mL em MeOH) (R_f: 3,86 min).



Cromatógrafo Varian®, coluna Kromasil® ODS (5 µm) fase reversa C-18 (25 x 4,5 mm) em temperatura de 24 ± 2 °C. Solventes utilizados: H₂O:ácido acético (1%; v/v) (solvente A) e MeOH:ACN (90:10 v/v; solvente B). O gradiente utilizado foi 35 - 100% de B por 60 min com vazão de 1 mL/min e detecção em 254 nm (n=3).

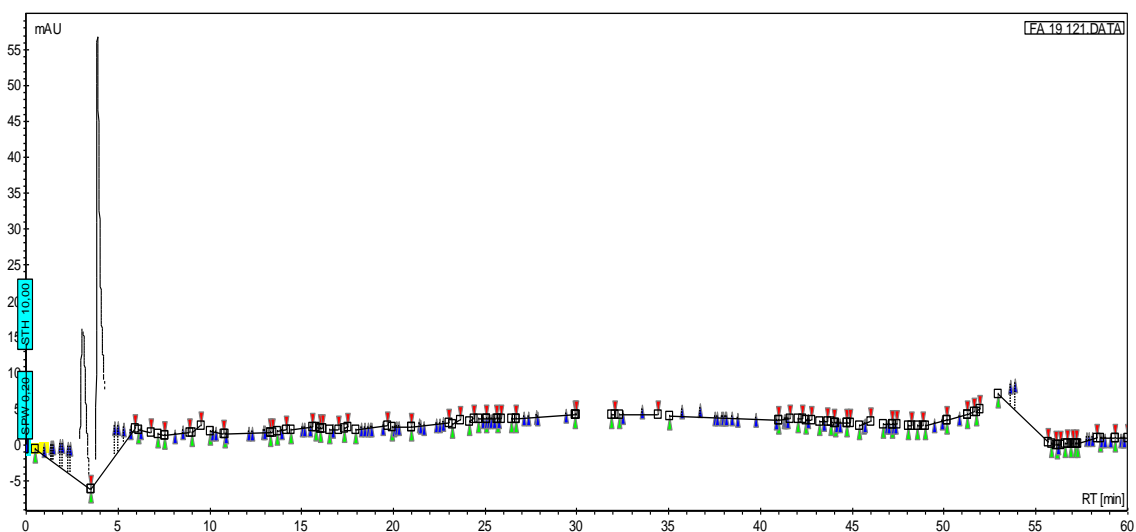
O cromatograma do ácido gálico foi analisado e comparado aos cromatogramas das frações em estudo relacionados a seguir.

Figura 23. Cromatografia líquida de alta eficiência da fração FAIII6-8 (1 mg/mL em MeOH).



Cromatógrafo Varian®, coluna Kromasil® ODS (5 μ m) fase reversa C-18 (25 x 4,5 mm) em temperatura de 24 ± 2 °C. Solventes utilizados: H₂O:ácido acético (1%; v/v) (solvente A) e MeOH:ACN (90:10 v/v; solvente B). O gradiente utilizado foi 35 - 100% de B por 60 min com vazão de 1 mL/min e detecção em 254 nm (n=3).

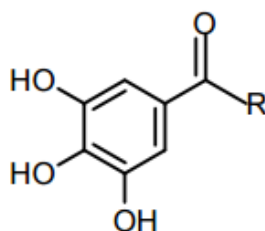
Figura 24. Cromatografia líquida de alta eficiência da fração FAI25-31ACN (1 mg/mL em MeOH).



Cromatógrafo Varian®, coluna Kromasil® ODS (5 μ m) fase reversa C-18 (25 x 4,5 mm) em temperatura de 24 ± 2 °C. Solventes utilizados: H₂O:ácido acético (1%; v/v) (solvente A) e MeOH:ACN (90:10 v/v; solvente B). O gradiente utilizado foi 35 - 100% de B por 60 min com vazão de 1 mL/min e detecção em 254 nm (n=3).

Assim, os dados obtidos indicaram que o ácido gálico ou ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico (Fig. 25) representa a substância química majoritária das frações FAI25-31ACN e FAIII6-8. É a primeira vez que essa substância é identificada na espécie *Croton campestris*, sendo um flavonóide polifenólico encontrado em diversos produtos naturais e em alimentos como chás, vinho, castanhas etc. (Liao et al., 2012; Locatelli et al., 2013).

Figura 25. Estrutura química do ácido gálico.

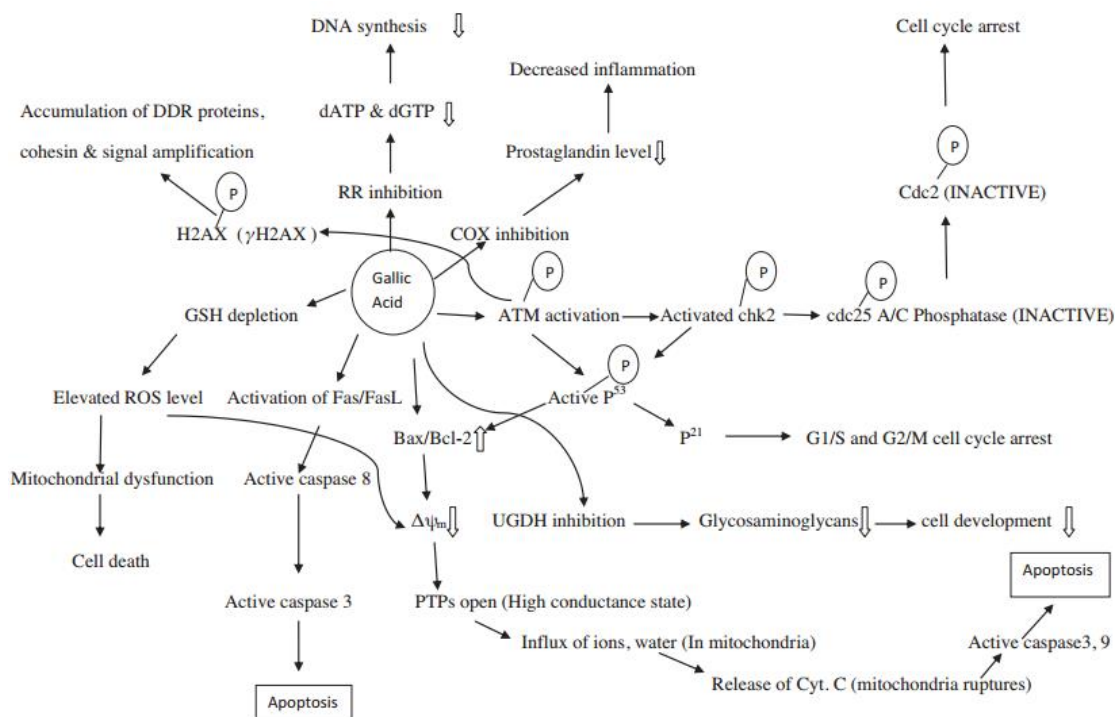


Estudos mostram que essa substância demonstra uma variedade de atividades biológicas como a forte ação antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica, antitumoral e antiproliferativa (Chen et al., 2012; Albishi et al., 2013; Lee et al., 2013; Lee e Je, 2013; Locatelli et al., 2013). A ação dessa substância foi citada como tendo um efeito citotóxico seletivo, ou seja, afetando preferencialmente células tumorais e não as linhagens celulares normais (Salucci et al., 2002; Locatelli et al., 2013). Os autores reportam que a atividade antitumoral do ácido gálico está envolvida com múltiplos alvos moleculares, que podem diferir de acordo com o tipo de linhagem tumoral utilizada (Locatelli et al., 2013; Verma et al., 2013). Uma das ações dessa substância ocorre pela depleção do sistema de glutathione reduzida, o que eleva a concentração de espécies reativas de oxigênio e gera um dano mitocondrial, culminando em morte celular. Além disso, outros efeitos como inibição de genes relacionados ao ciclo celular e apoptose, bem como atividade inibitória do fator de transcrição NF-κB, sobre a via de sinalização Akt e a enzima ciclooxygenase 2 (Russel et al., 2012; Locatelli et al., 2013).

Os resultados dos estudos farmacológicos *in vivo* e *in vitro* obtidos a partir de frações ativas de *Croton campestris* estão de acordo com os dados expressados na literatura para essa substância e serão discutidos a seguir.

A figura a seguir ilustra o efeito do ácido gálico em diversas vias de sinalização relacionadas à oncogênese.

Figura 26. Representação diagramática do efeito do ácido gálico em várias vias envolvidas na oncogênese.



Fonte: Verma et al., 2013.

4.2.3. As frações FAI25-31ACN e FAIII6-8 apresentam componentes descritos para o gênero *Croton*

As frações avaliadas no modo ESI (+) e ESI (-), e os valores experimentais de massas obtidos foram comparados aos valores teóricos (Tab. 13). Para que a correlação dos dados obtidos pudesse ser feita com maior exatidão, foi considerado um erro experimental inferior a 15 ppm. Assim, com base na literatura a fração FAI25-31ACN apresentou no modo ESI(+) os componentes 3'-(4"-hidroxi-3",5"- dimetoxifenil)-propil benzoato, neocrotocembranal e ent-1α- acetoxi-7β,14α-dihidroxi-kaur-16-en-15-one. Já no modo ESI(-) foi possível detectar os componentes ácido cafeico, (2S)-7,9-dimetoxi rhododendrol. A fração FAIII6-8 apresentou no modo ESI(+) apenas o composto muscicapina C. Já no modo ESI(-) foram detectadas as substâncias (2S)-7,9-dimetoxi rhododendrol, velamona, traquilobano-7β,18-diol, crotonadiol, plaunotol, trans-desidrocrotonina, cys-desidrocrotonina, (12R)-12-hidroxicascarilona e 3β-hidroxi-19-O-acetil-pimara-8(9),15- dien-7-one. O ESI(-) apresentou melhores resultados pois os extratos e frações analisados são ricos em polifenóis, que ionizam melhor neste modo. Foram realizados experimentos com o ESI(+) também, porém, as amostras

apresentam uma série de impurezas que são ionizadas no modo positivo e dificultam a detecção dos compostos de interesse devido a supressão iônica destas substâncias indesejáveis. Estas impurezas são em geral polímeros provenientes de detergente e plásticos.

Tabela 13. Compostos detectados nas frações ativas FAI25-31ACN e FAIII6-8 através de HRESI-M.

Composto	Fórmula Molecular	Massa Molecular	HRESI-MS						Referência	Amostra
			[M + H] ⁺			[M - H] ⁻				
			m/z Experimental	m/z Teórico	Erro (ppm)	m/z Experimental	m/z Teórico	Erro (ppm)		
Ácido cafeico	C ₉ H ₈ O ₄	180,157769	-	-	-	179,03415	179,03389	1,48	6	FAI25-31ACN
(2S)-7,9-dimetoxi rhododendrol	C ₁₂ H ₁₈ O ₄	226,269384	-	-	-	225,11286	225,11214	3,22	7, 8, 9	FAI25-31ACN e FAIII6-8
3'-(4"-hidroxi-3",5"-dimetoxifenil)-propil benzoato	C ₁₈ H ₂₀ O	252,351466	253,15721	253,15869	-5,85	-	-	-	7, 8, 9	FAI25-31ACN
Neocrotocembranal	C ₂₀ H ₃₀ O	286,452345	287,24013	287,23694	11,1	-	-	-	7, 8, 9	FAI25-31ACN
Velamona	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	300,435869	-	-	-	299,20164	299,20056	3,62	1, 2	FAIII6-8
Traquilobano-7β,18-diol	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	304,467632	-	-	-	303,2328	303,23186	3,11	7, 8, 9	FAIII6-8
Crotonadiol	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	306,483513	-	-	-	305,24882	305,24751	4,3	7, 8, 9	FAIII6-8
Plaunotol	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	306,483513	-	-	-	305,24882	305,24751	4,3	7, 8, 9	FAIII6-8
Trans-desidrocrotonina	C ₁₉ H ₂₂ O ₄	314,376298	-	-	-	313,14489	313,14344	4,64	4, 7	FAIII6-8
Cys-desidrocrotonina	C ₁₉ H ₂₂ O ₄	314,376298	-	-	-	313,14489	313,14344	4,64	4, 7	FAIII6-8
Muscicapina C	C ₂₀ H ₂₉ NO ₂	315,450513	316,22926	316,22711	6,81	-	-	-	7, 8, 9	FAIII6-8
(12R)-12-hidroxiscarilona	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	318,451155	-	-	-	317,21192	317,21112	2,52	3, 5, 7	FAIII6-8
3β-hidroxi-19-O-acetil-pimara-8(9),15- dien-7-one	C ₂₂ H ₃₂ O ₄	360,487914	-	-	-	359,22282	359,22169	3,16	7, 8, 9	FAIII6-8
Ent-1α- acetoxi-7β,14α-dihidroxi-kaur-16-en-15-one	C ₂₄ H ₃₂ O ₈	448,507005	449,21412	449,21699	-6,4	-	-	-	7, 8, 9	FAI25-31ACN

Referências: 1-Babili et al., 1998; 2- Babili et al., 2006; 3- Puebla et al., 2003; 4- Kubo et al., 1991; 5- Yannai 2012; 6- Junior et al., 2014; 7- Salatino et al., 2007; 8- Ngadjui et al., 1999; 9- Sutthivaiyakit et al., 2001.

4.3. Avaliação da atividade farmacológica *in vivo* das frações ativas de *Croton campestris* A.St.-Hil.

Para os estudos em modelos experimentais utilizando animais de laboratório foram selecionadas as frações FAI25-31ACN e FAIII6-8 pois apresentaram perfil fitoquímico semelhante à fração com melhor perfil de atividade obtida durante o trabalho de mestrado (CFqb14). Dessa forma, essas frações foram avaliadas em modelo de tumor sólido de Ehrlich, em modelo de edema de pata, edema de orelha e peritonite induzida por carragenina. Esses

experimentos foram eleitos devido à provável relação inflamação/câncer observada nos estudos anteriores com as amostras de *Croton campestris* e aos crescentes relatos dessa interação.

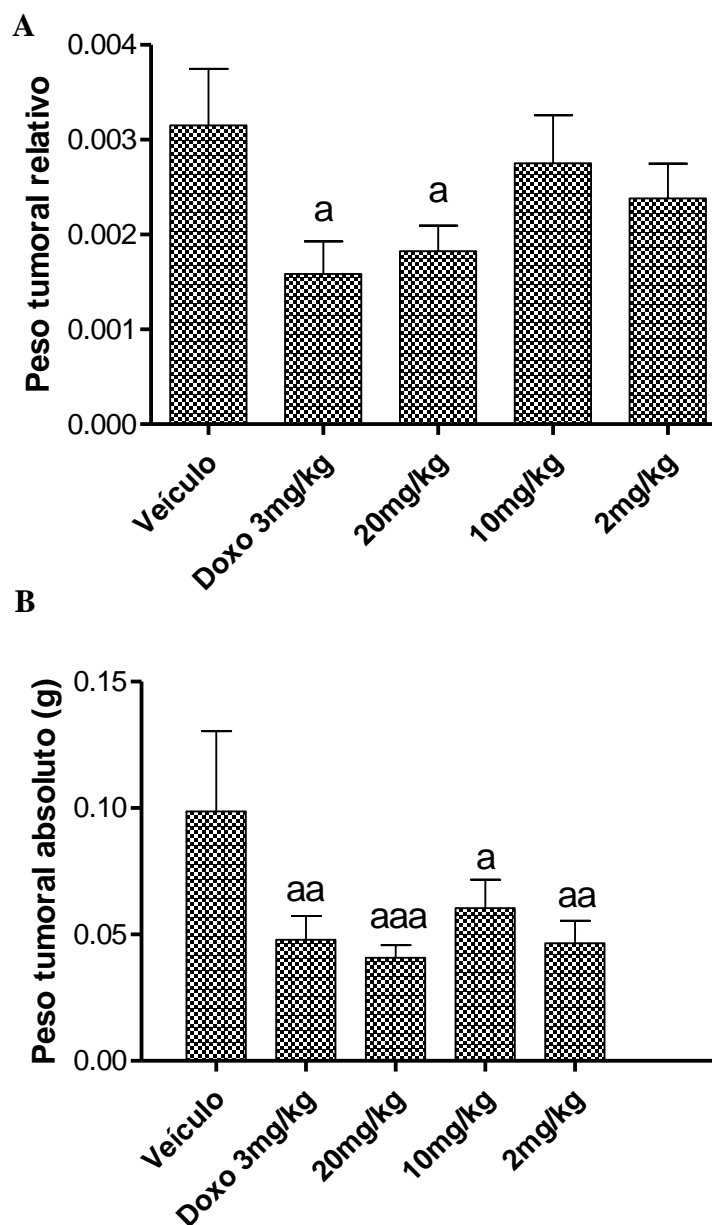
4.3.1. A fração FAI25-31 ACN apresenta DL_{50} superior à 80 mg/kg

Os animais tratados com 500 mg/kg (IP) apresentaram sinais extremos de toxicidade, tais como atividade locomotora diminuída, piloereção, contorção abdominal e morte em menos de 4 horas. Os animais tratados com 125 mg/kg vieram a óbito em menos de 24 horas e, apesar de apresentarem alguns sinais de toxicidade, os animais tratados com 50 mg/kg não morreram. Na dose de 30 mg/kg os animais apresentaram apenas contorções abdominais, não havendo morte no período de 14 dias de teste, além de continuarem ganhando peso normalmente. No entanto, a fim de garantir que os experimentos futuros se desenvolvessem sem a ocorrência de morte dos animais, a dose de 30 mg/kg (IP) foi escolhida como dose máxima a ser utilizada dessa fração. Com base nesses resultados, a DL_{50} calculada para a amostra FAI25-31ACN foi de 83 mg/kg (IP).

4.3.2. As frações FAI25-31ACN e FAIII6-8 inibem o desenvolvimento tumoral do tumor sólido de Ehrlich

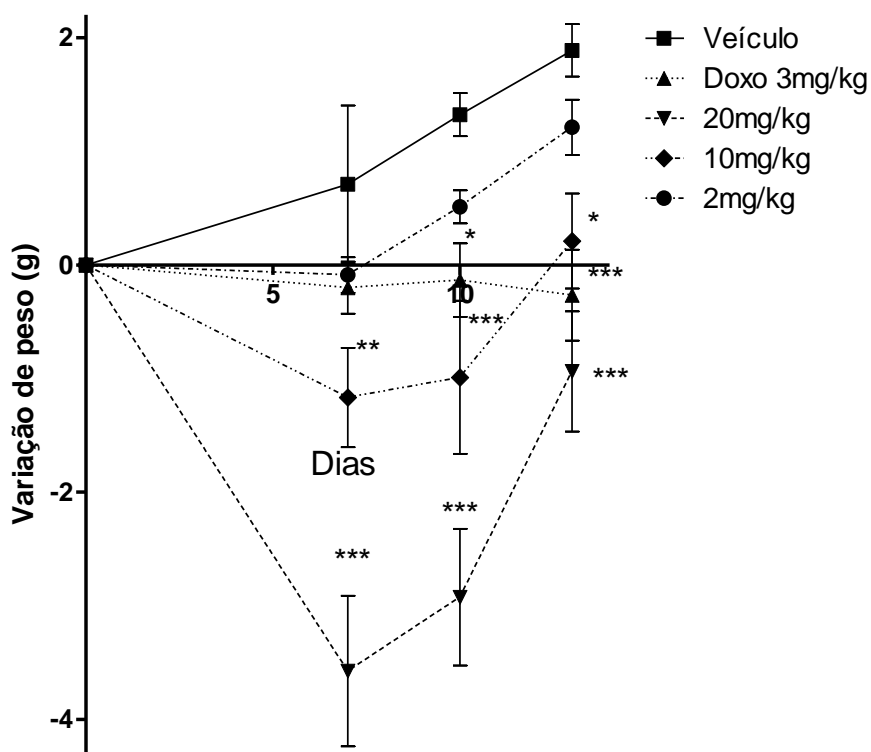
Nesse modelo experimental a fração FAI25-31ACN produziu inibição do crescimento tumoral semelhante ao observado no grupo tratado com a doxorrubicina, quimioterápico utilizado como controle positivo (Fig. 26). Assim, os animais tratados com 20 mg/kg da fração apresentaram 41,9% de redução tumoral relativa e 59,3% se considerarmos o peso absoluto do tumor. Nesse sentido, se considerarmos o peso tumoral absoluto, todos os animais tratados apresentaram significativa redução do crescimento do tumor. O tratamento com doxorrubicina reduziu o crescimento tumoral em 51,5%, e em 39,5% e 53,4% para os animais tratados com 10 e 2 mg/kg de FAI25-31ACN, respectivamente. Esses resultados demonstram a potente atividade dessa fração, apesar de a mesma ainda não estar purificada. Além disso, como já observado em resultados anteriores (Monteiro, 2012), a atividade *in vivo* mostra-se mais potente que o perfil citostático normalmente observado no teste de atividade antiproliferativa *in vitro*. Isso corrobora a sugestão de que a metabolização ou o mecanismo de ação dos componentes ativos envolvidos potencializam os efeitos antitumorais dos derivados de *Croton campestris*.

Figura 26. A) Peso relativo do tumor sólido induzido por células de Ehrlich em flanco de camundongo após o tratamento com a fração FAI25-31ACN (Croton) de *Croton campestris*. B) Peso tumoral absoluto.



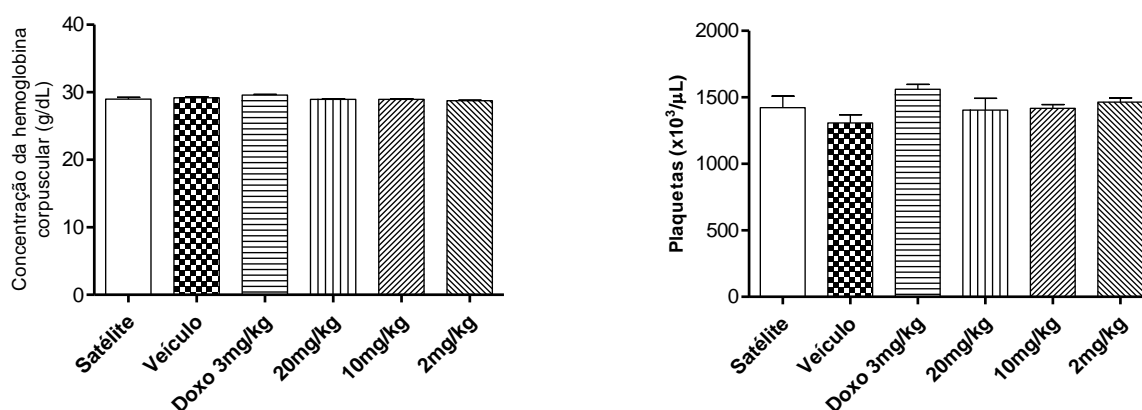
O peso relativo representa a média da razão entre o peso do tumor (g) e o peso corporal do animal (g). Valores representam média \pm SEM de n=até 8. Apesar da tendência na redução do tumor, não houve diferença estatística no teste *One way ANOVA* seguido de teste Tukey. A avaliação estatística calculada pelo teste *t* apresentou diferença significativa de ^ap<0,05, ^{aa}p<0,01 ou ^{aaa}p<0,001 em relação ao grupo veículo.

Figura 27. Variação do peso corporal dos grupos durante o tratamento com a fração FAI 25-31ACN (Croton) de *Croton campestris*.



Valores representam média \pm SEM de n=até 8. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, diferença estatística com relação ao grupo veículo (*One way ANOVA* seguido de teste Tukey).

Observando o gráfico de variação de peso corporal, verificamos que apesar de apresentar efeito antitumoral, a fração FAI 25-31ACN reduziu o peso dos animais, sugerindo toxicidade elevada (Fig. 27). Muitas vezes, os efeitos colaterais tóxicos e a atividade anticâncer promissora de uma nova substância podem estar correlacionados. Mesmo quimioterápicos já utilizados na clínica apresentam diversos efeitos colaterais, entre eles, a perda de peso. A própria doxorubicina, um dos antineoplásicos mais utilizados, tem aplicação limitada por seus efeitos colaterais, como toxicidade à medula óssea, distúrbios gastrointestinais, estomatite, alopecia, edema, cardiotoxicidade aguda e cumulativa (Graeser et al., 2010).



Leucócitos totais (WBC), eritrócitos (RBC), hemoglobina (Hbg), hematócrito (Hct), MCV (volume corpuscular médio), MCH (hemoglobina corpuscular média), MCHC (concentração da hemoglobina corpuscular) e plaquetas (Ptl). Valores representam média \pm SEM de $n=$ até 8. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, diferença estatística com relação ao grupo veículo. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$, diferença estatística com relação ao grupo satélite (*One way ANOVA* seguido de teste Tukey).

Por atuar em células com taxas elevadas de divisão celular, os quimioterápicos acabam atuando também em células não neoplásicas tais como trato gastrointestinal, folículos pilosos, gônadas e as da medula óssea (Souza et al., 2008). Por isso, valores de leucócitos geralmente encontram-se diminuídos pela depressão da produção de precursores da linhagem hematopoiética causada como efeito colateral do uso de diversos quimioterápicos. Dessa maneira, o efeito observado após o tratamento com as maiores doses de FAI25-31 ACN reflete esse que é um dos principais efeitos colaterais observados com o tratamento de quimioterápicos.

Do ponto de vista clínico, o efeito tóxico é obviamente maléfico ao paciente, uma vez que pode trazer um risco frente à fragilidade imunológica. No entanto, do ponto de vista investigativo, esse efeito sugere que os princípios ativos em estudo têm características farmacológicas em comum com os quimioterápicos. Além disso, a diminuição do número de leucócitos é um fator positivo quando consideramos o microambiente tumoral (Grivennikov, 2013). Assim, a diminuição de leucócitos no sangue pode estar relacionada a diminuição do recrutamento leucocitário. Sabe-se que o próprio tumor pode recrutar células imunes inflamatórias e superexpressar mediadores inflamatórios gerando o “*Tumor elicited inflammation*”, ou seja, inflamação provocada por tumor (Grivennikov et al., 2010; Grivennikov et al., 2012). Assim, a modulação do microambiente tumoral pode ser favorável na inibição do desenvolvimento das células tumorais (Hanahan & Weinberg, 2011)

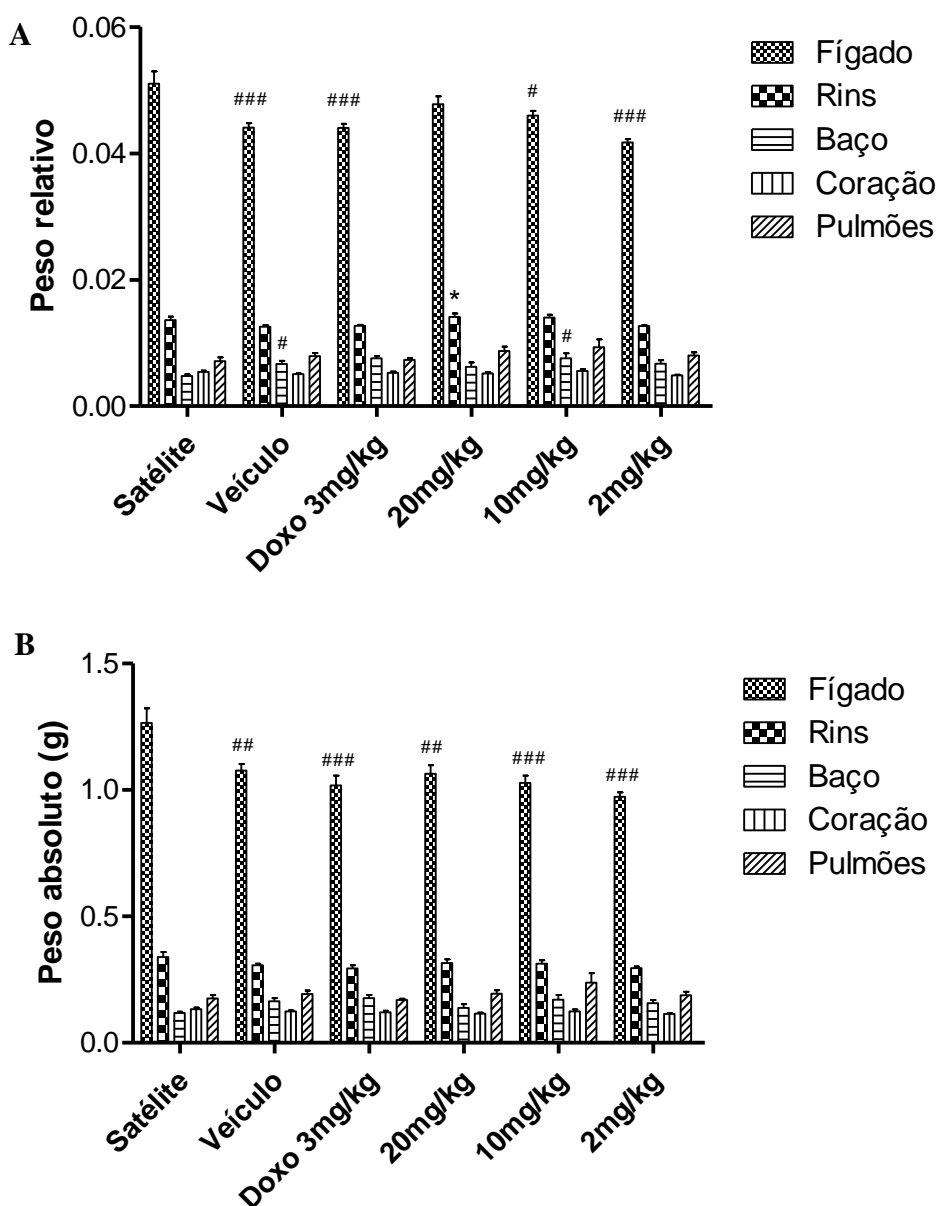
A quimioterapia tange a eficácia e a toxicidade, por isso muitas vezes como consequência desse tratamento os pacientes apresentam uma série de parâmetros alterados,

como é o caso do hemograma. Por outro lado, anemia não foi um fator observado nos animais após o experimento, sendo esse um efeito colateral também observado em pacientes em tratamento por quimioterapia.

Com relação à série eritrocitária, o volume corpuscular médio (MCV) apresentou-se diminuído para todos os grupos tratados, revelando uma tendência à anemia microcítica (Fig. 28). Ou seja, os eritrócitos apresentaram-se diminuídos e a concentração de hemoglobina corpuscular presente nessa série também diminuiu para os 3 grupos experimentais. Os sinais de toxicidade observados para o grupo tratado com doxorrubicina são coerentes com a mielossupressão causada pelo uso desse fármaco (Coppoc, 1992).

A diminuição plaquetária, frequentemente observada nos pacientes tratados por quimioterapia devido à supressão medular, não foi observada para os grupos experimentais. De forma oposta, para os grupos tratados com doxorrubicina e com a menor dose de FAI25-31ACN, observou-se um estado de plaquetose, o que não corresponde ao resultado observado para série leucocítica, visto que a produção dessas células está relacionada com a produção medular (Fig. 28). No entanto, a plaquetose pode ser relacionada à presença do tumor em si e não com o tratamento, uma vez que um dos fenômenos paraneoplásicos é o recrutamento de plaquetas para a corrente sanguínea.

Figura 29. A) Peso relativo dos órgãos após tratamento com a fração FAI25-31 ACN de *Croton campestris*. B) Peso absoluto dos órgãos.



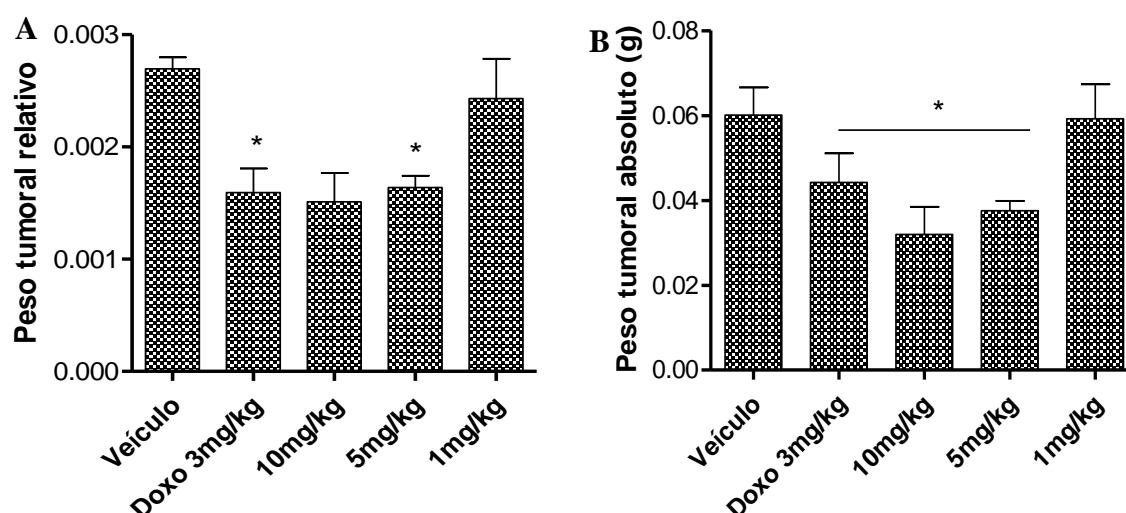
O peso relativo representa a média da razão entre o peso do órgão (g) e o peso corporal do animal (g). Valores representam média \pm SEM de n=até 8. * $p < 0,05$, diferença estatística com relação ao grupo veículo. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$, diferença estatística com relação ao grupo satélite (*One way ANOVA* seguido de teste Tukey).

O aumento de peso dos órgãos quando associado às análises histopatológicas podem indicar toxicidade (Cunha *et al.*, 2009). Por outro lado, esse fato pode ser resultado de resposta adaptativa do organismo e não necessariamente indicação de toxicidade (Rhombert *et al.*, 2007). Dessa forma, as análises realizadas (Fig. 29) mostram aumento do peso relativo de

órgãos como fígado e rins, dos grupos tratados com FAI25-31ACN nas maiores doses quando comparados aos controles.

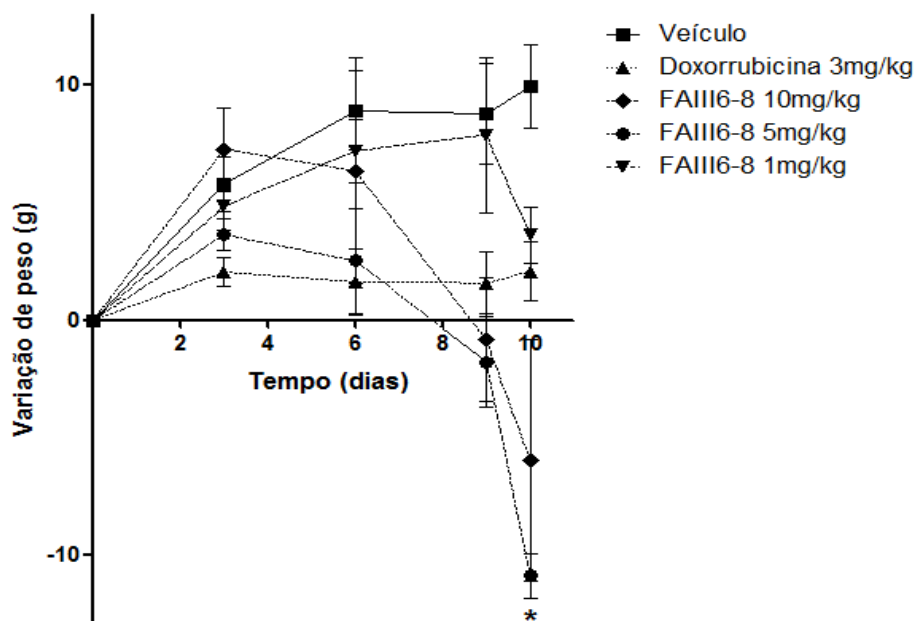
A fim de se obter massa suficiente para o aprofundamento dos estudos de atividade farmacológica, novos fracionamentos originaram a fração FAIII6-8, que também foi empregada no experimento de avaliação de atividade antitumoral em modelo de tumor sólido de Ehrlich. Novamente, a fração foi efetiva na inibição do crescimento tumoral absoluto nas doses de 5 e 10 mg/kg (Fig. 30) de forma semelhante ao controle positivo doxorrubicina. Os animais tratados com 5mg/kg da fração tiveram 40,7% de redução tumoral relativa e 36,7% se considerarmos o peso absoluto do tumor. Também observamos a diminuição da massa tumoral absoluta em 26,7% para os animais tratados com a doxorrubicina e em 46,7% para os animais tratados com 10mg/kg de FAIII6-8. Portanto, se considerarmos o peso tumoral absoluto, com exceção do grupo tratado com 1 mg/kg de FAIII6-8, todos os animais tratados apresentaram significativa redução do crescimento do tumor. Comparativamente à fração FAI25-31 sua atividade foi mais potente, uma vez que foi efetiva com metade da dose utilizada no primeiro caso. Isso significa que pode ter ocorrido uma maior concentração dos componentes ativos nessa fração, ainda que qualitativamente elas se apresentem semelhantes.

Figura 30. A) Peso relativo do tumor sólido induzido por células de Ehrlich em flanco de camundongo após o tratamento com a fração FAIII6-8 de *Croton campestris*. B) Peso tumoral absoluto.



O peso relativo representa a média da razão entre o peso do tumor (g) e o peso corporal do animal (g). Valores representam média \pm SEM de n=até 8. *p < 0,05, diferença estatística com relação ao grupo veículo (One way ANOVA seguido de teste Tukey).

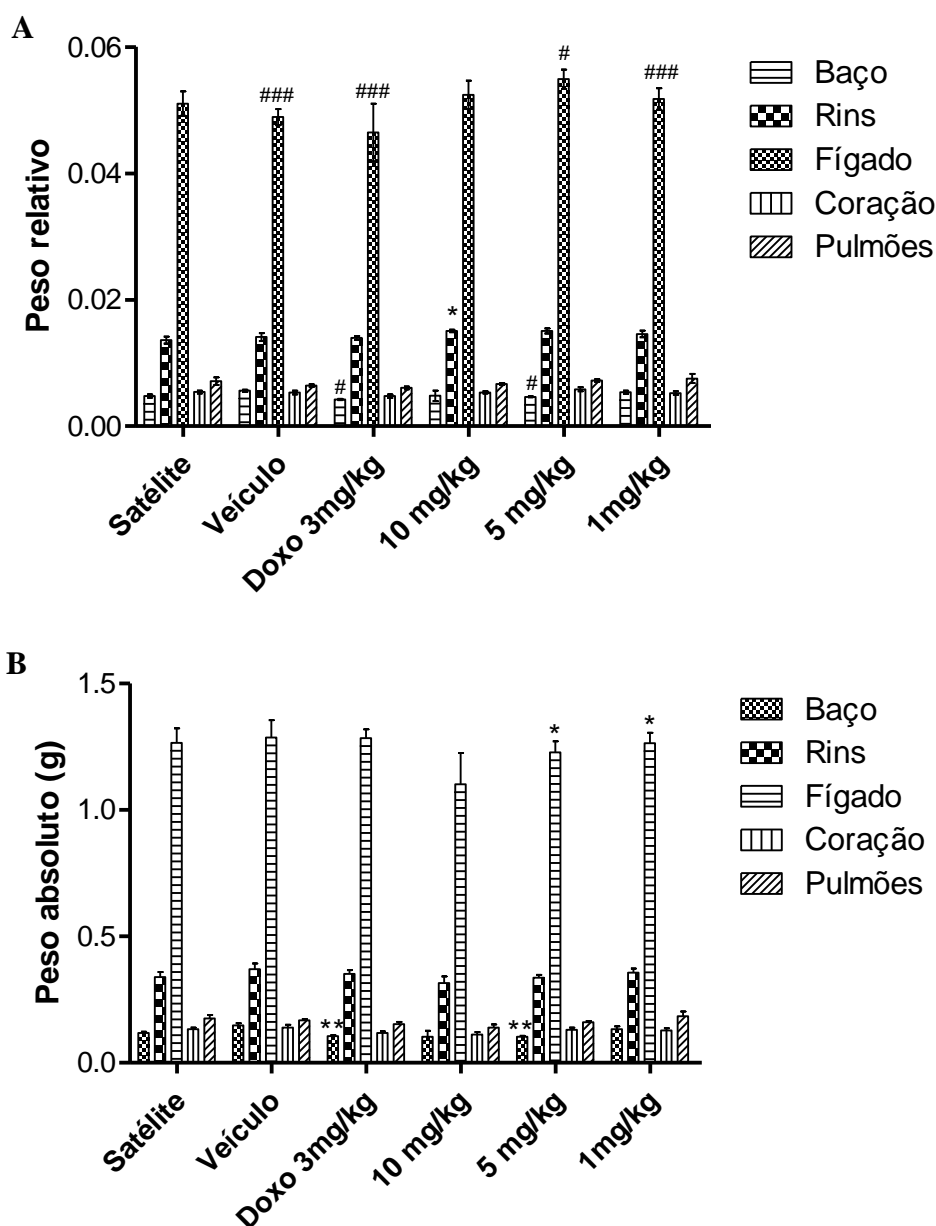
Figura 31. Variação do peso corporal dos grupos durante o tratamento com a fração FAIII6-8 de *Croton campestris*.



Valores representam média \pm SEM de n=até 8. * $p < 0,05$, diferença estatística com relação ao grupo veículo (*One way ANOVA* seguido de teste Tukey).

Foi possível verificar que houve maior média de perda de peso para o grupo tratado com 5 mg/kg da fração FAIII6-8 (Fig.31). Comparado ao tratamento com a fração FAI25-31ACN, que não apresentou significativa redução tumoral, os animais perderam mais peso. Esse resultado pode estar relacionado ao fato dos componentes ativos que controlam a proliferação das células tumorais também serem dotados desse efeito colateral.

Figura 32. A) Peso relativo dos órgãos após tratamento com a fração FAIII6-8 de *Croton campestris*. B) Peso absoluto dos órgãos.



O peso relativo representa a média da razão entre o peso do órgão (g) e o peso corporal do animal (g). Valores representam média \pm SEM de $n=$ até 8. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, diferença estatística com relação ao grupo veículo. # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$, diferença estatística com relação ao grupo satélite (*One way ANOVA* seguido de teste Tukey).

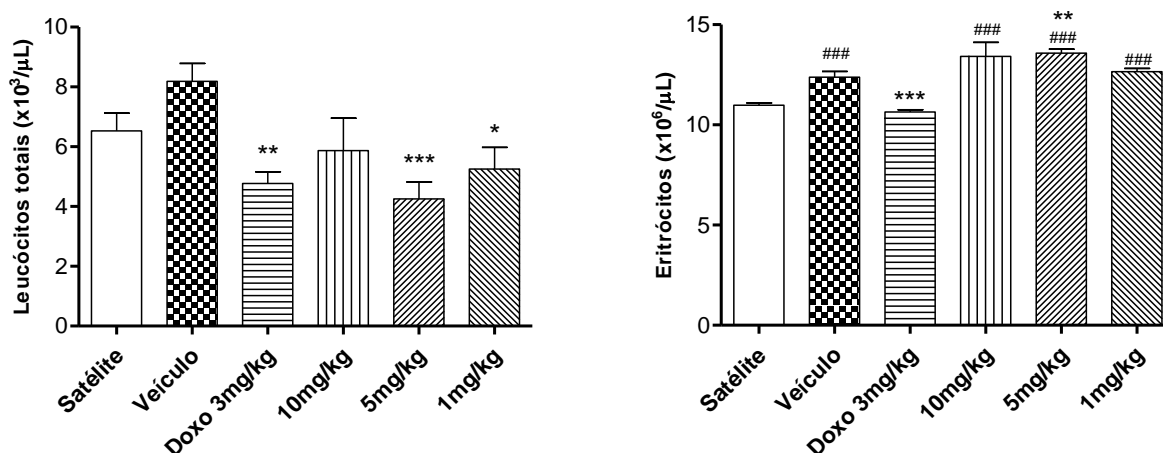
Também no tratamento com a fração FAIII6-8 os animais tiveram aumento de peso relativo de órgãos como rins e fígado, além de algumas alterações hematológicas leves (Fig. 31 e Fig. 32). A questão da metabolização de substâncias pode ser um fator importante para esse fato já que a biotransformação de substâncias influencia diretamente órgãos de detoxificação

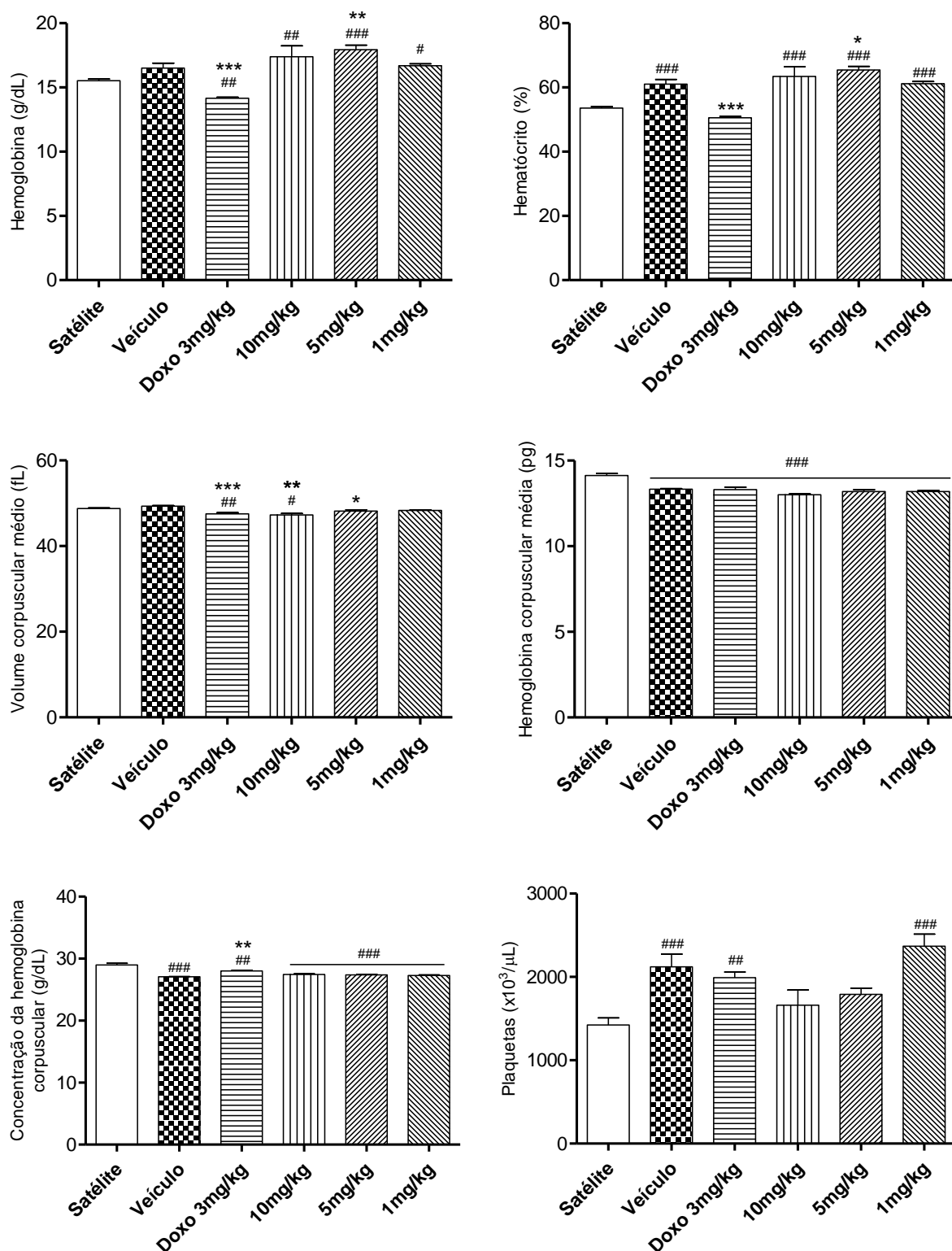
como os que se apresentaram aumentados. Além disso já é bem descrito na literatura a hepatotoxicidade devido ao uso de substâncias anticâncer e anti-inflamatórias, atividades também apresentadas pelas frações em estudo (Bessone, 2010; Araujo, 2012; Fukasawa et al., 2014).

Na avaliação dos parâmetros sanguíneos, os animais tratados com doxorrubicina e com 5 e 1 mg/kg da fração FAIII6-8 apresentaram significativa redução de leucócitos circulantes. Conforme supracitado, essa redução pode ser indicação de modulação da inflamação associada ao microambiente tumoral, pois em geral leucócitos são recrutados para este ambiente a fim de amplificar a resposta inflamatória e promover o desenvolvimento tumoral. Já para os eritrócitos, enquanto o tratamento com o quimioterápico doxorrubicina levou à sua diminuição, os animais tratados tiveram aumento desse parâmetro para todas as doses. O mesmo ocorreu para a hemoglobina. Com relação ao número de plaquetas, observou-se que os grupos veículo e doxorrubicina, apresentaram aumento em relação ao grupo satélite, enquanto os grupos tratados com a fração FAIII6-8 nas doses 5 e 10 mg/kg não apresentou alteração quando comparados ao grupo satélite.

Queiroz e colaboradores (2004) descrevem efeito mielossupressor produzido pelo tumor ascítico de Ehrlich *per se* havendo, portanto, queda no número de hemocitoblastos da medula óssea. Além disso, nesse tipo de tumor pode haver migração dessas células progenitoras hematopoiéticas para o baço, o que é coerente com aumento esplênico observado para animais tratados com doxorrubicina e com 5 mg/kg da fração FAIII6-8 (Fig. 32).

Figura 33. Hemograma do sangue total dos animais após tratamento com a fração FAIII6-8 de *Croton campestris*.





Leucócitos totais (WBC), eritrócitos (RBC), hemoglobina (Hbg), hematócrito (Hct), MCV (volume corpuscular médio), MCH (hemoglobina corpuscular média), MCHC (concentração da hemoglobina corpuscular) e plaquetas (Ptl). Valores representam média \pm SEM de $n \leq 8$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, diferença estatística com relação ao grupo veículo. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$, diferença estatística com relação ao grupo satélite (*One way ANOVA* seguido de teste Tukey).

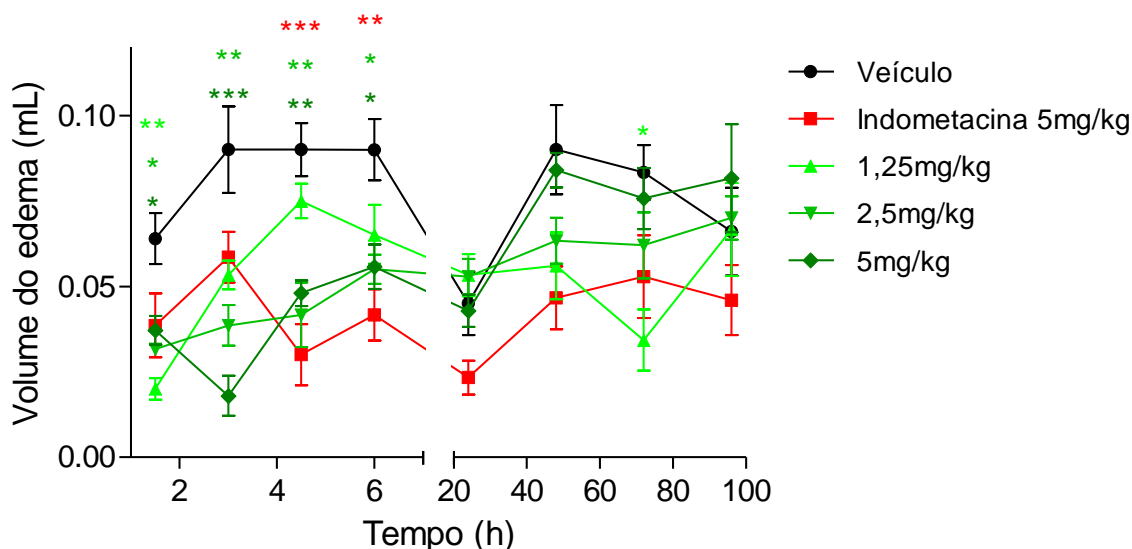
Conforme discutido anteriormente, o componente majoritário das frações FAI25-31ACN e FAIII6-8 é o ácido gálico. Essa substância tem sido amplamente estudada, e os dados de atividade antitumoral obtidos para as frações ativas estão de acordo com o que vem sendo apresentado para o ácido gálico (Russel et al., 2012; Locatelli et al., 2013; Verma et al., 2013). O ácido gálico é visto, inclusive, como um “rival do câncer” já que atua na modulação de genes relacionados ao ciclo celular, metástase, angiogênese, entre outros (Park, 2016; Singh et al., 2016; Subramanian et al., 2016; Sun et al., 2016). Dessa maneira, sua elevada concentração nas frações ativas pode estar relacionada à atividade antitumoral observada.

Uma das abordagens na busca por novos agentes anticâncer é a compreensão do microambiente tumoral como um local dinâmico com a participação de diversos tipos celulares e moléculas. Uma das relações mais importantes e muito em voga recentemente, é a relação câncer-inflamação, que responde por 20% dos cânceres que são precedidos de inflamação crônica anterior. Sendo assim, a inflamação é um dos mais importantes estímulos do microambiente tumoral durante a carcinogênese, sendo categorizada como um *hallmark* do câncer, e pode atuar na iniciação e na promoção tumoral (Hanahan & Weinberg, 2011; Vendramini-Costa et al., 2017). Somado a esse fato, há relatos do uso popular de *Croton campestris* como planta medicinal anti-inflamatória (Santos et al., 2005; Babili et al., 2006). Portanto, a fim de avaliar a atividade anti-inflamatória de frações ativas de *Croton campestris* foram realizados testes *in vivo* de edema de pata, peritonite e edema de orelha.

4.3.3. A fração CFqb14 inibe a primeira fase da inflamação em modelo de edema de pata induzido por carragenina, inibe a migração de leucócitos e diminui a concentração da enzima mieloperoxidase em modelo de peritonite induzida por carragenina

Nas doses de 2,5 e 5 mg/kg a fração CFqb14 apresentou diminuição da evolução do edema com inibição da primeira fase da inflamação (Fig. 34). Já na segunda etapa do processo inflamatório, houve diminuição significativa do edema apenas com a menor dose.

Figura 34. Efeito da fração CFqb14 em edema de pata induzido por carragenina expressado em volume (mL) por tempo após indução da inflamação (horas).



Valores representam média \pm SEM de $n=8$. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$, diferença estatística com relação ao grupo veículo (*One way ANOVA* seguido de teste Tukey).

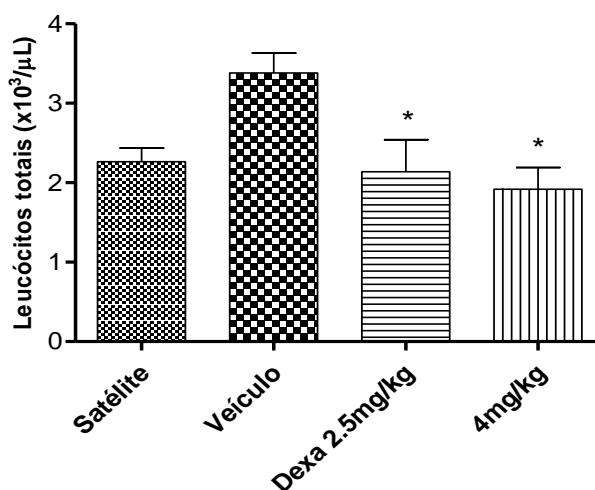
A fase inicial desse modelo de estudo ocorre em até 6 horas após a indução da inflamação e a segunda etapa, tardia, ocorre após a sexta hora, durando aproximadamente 72 horas, com pico inflamatório entre a 48^a e 72^a hora. Dentre os principais mediadores inflamatórios relacionados com a fase inicial da inflamação estão a serotonina, fosfolipase A2, histamina, bradicinina, metabolitos do ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotrienos) e óxido nítrico. Já a fase tardia estaria relacionada com a mobilização de neutrófilos (fase celular), quando a expressão de COX-2 está aumentada e a produção de óxido nítrico está diminuída (Posadas et al., 2004).

Dados anteriores mostraram que, em tumor sólido de Ehrlich induzido pela inoculação das células no subcutâneo da pata de camundongos, o tratamento com EBA nas doses de 5, 10 e 20 mg/kg (selecionadas a partir de experimentos de toxicidade aguda) reduziu de forma significativa e dose dependente o desenvolvimento tumoral, com efeito máximo de 65% para a dose mais elevada. Além disso, o tratamento realizado com a fração CFqb14 nas doses de 1, 2 e 4 mg/kg também produziu inibição do desenvolvimento tumoral, indicando que a atividade específica aumentou em cinco vezes comprovando que essa fração concentrou os componentes ativos (Monteiro, 2012).

Os dados de atividade anti-inflamatória, correlacionados com o resultado positivo frente à inibição do tumor no modelo de tumor de pata induzido pelas células de Ehrlich (Monteiro, 2012), sugerem uma correlação entre a atividade anticâncer e anti-inflamatória, já que a inibição de mediadores inflamatórios favorece a atividade antiproliferativa e a diminuição do desenvolvimento tumoral (Vendramini-Costa & Carvalho, 2012). Os resultados mostram também a inibição da fase inicial da inflamação, o que pode estar diretamente ligada ao bloqueio de mediadores inflamatórios como as prostaglandinas. Estudos específicos devem ser realizados para elucidar a relação da atividade anticâncer e anti-inflamatória das frações de *Croton campestris*.

A indução de inflamação por carragenina leva ao aumento da permeabilidade vascular, promovendo uma ação inicial de histamina e serotonina e, mais tarde, induz inflamação aguda pela ação de bradicinina e prostaglandinas, fatores quimiotáticos que vão atrair diversos tipos de leucócitos para o local da inoculação. Essas células, por sua vez, vão produzir mediadores pró-inflamatórios como citocinas, espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico, entre outros (Prajapati et al., 2014; Li et al., 2015; Furtado et al., 2016). Dessa forma, a fração CFqb14 apresentou proeminente efeito anti-inflamatório no modelo de peritonite induzida por carragenina, reduzindo significativamente o número de leucócitos dentro da cavidade abdominal (Fig. 35). Essa redução ocorreu de forma ainda semelhante ao observado no grupo tratado com o anti-inflamatório dexametasona. Novamente, através de outra metodologia experimental, o efeito anti-inflamatório dessa amostra oriunda de *Croton campestris* é confirmado.

Figura 35. Efeito da fração CFqb14 em peritonite induzida por carragenina na contagem de leucócitos.

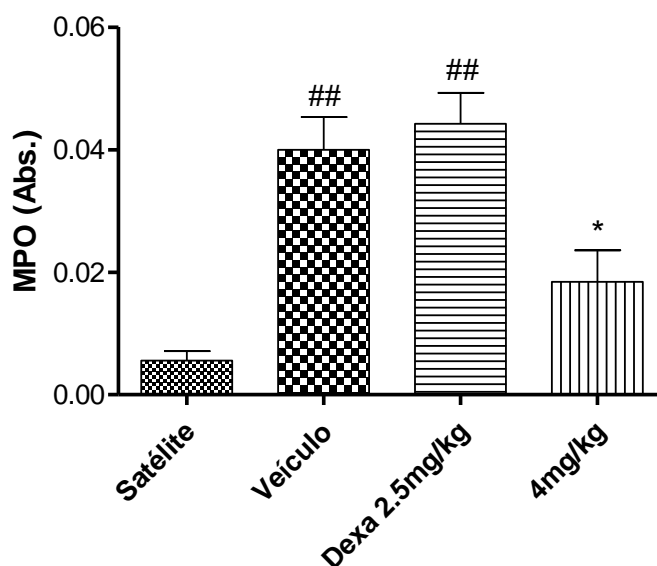


Valores representam média \pm SEM de n=6. *p<0,05, diferença estatística com relação ao grupo veículo (One way ANOVA seguido de teste Tukey).

O processo inflamatório presente no ambiente tumoral é caracterizado pela infiltração de leucócitos variando em tamanho, distribuição e composição, como macrófagos associados ao tumor, células natural killer, neutrófilos e outras, além de uma variedade de mediadores citotóxicos como $\text{TNF}\alpha$, interleucinas, enzimas como COX-2 e diversos fatores de transcrição. Todos esses mediadores, envolvidos no processo inflamatório, podem ter papel crucial nos diferentes passos da carcinogênese promovendo um ambiente vantajoso para o desenvolvimento tumoral (Vendramini-Costa & Carvalho, 2012). Por isso, a inibição de migração de células inflamatórias mediante o tratamento prévio com CFqb14 demonstra a característica anti-inflamatória da amostra, conectando também à atividade antitumoral já observada em outros modelos experimentais, reforçando a ligação da ação anti-inflamatória e antitumoral (Fig. 35). De fato, agentes citotóxicos, tais como doxorubicina, também inibem a migração de células inflamatórias, já que podem existir efeitos tóxicos em leucócitos, inibindo seu deslocamento (Vendramini-Costa et al., 2010).

A enzima mieloperoxidase (MPO) é encontrada predominantemente em neutrófilos e, por isso, sua presença indica a participação de neutrófilos ativos no sítio da inflamação e, portanto, aumento do processo inflamatório (Winterbourn & Brennan, 1997). Por isso, além da contagem de leucócitos, também foi feita a dosagem de mieloperoxidase no líquido peritoneal oriundo da indução de peritonite por carragenina.

Figura 36. Níveis da enzima mieloperoxidase no líquido peritoneal após indução de peritonite por carragenina frente os diferentes grupos experimentais avaliados.



Valores representam média \pm SEM de $n=6$. * $p < 0,05$, diferença estatística com relação ao grupo veículo. ## $p < 0,01$, diferença estatística com relação ao grupo satélite (One way ANOVA seguido de teste Tukey).

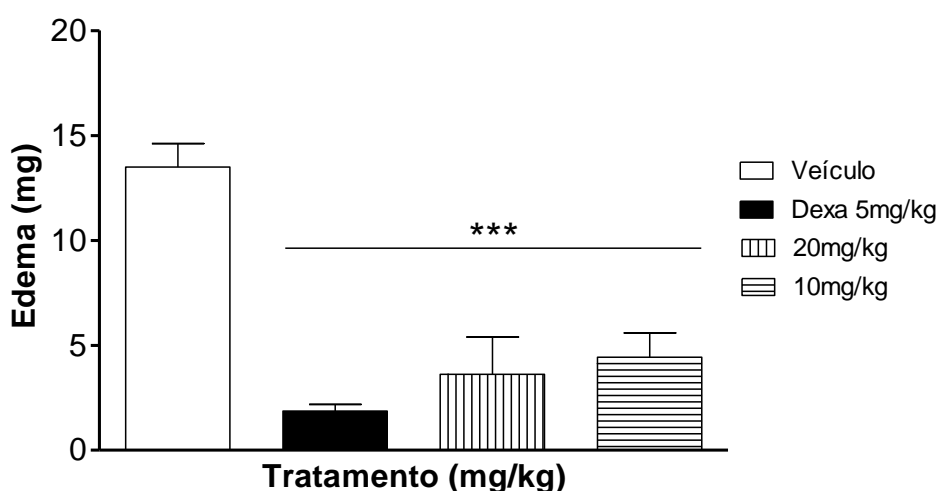
Corroborando o resultado obtido para a migração de leucócitos, que se encontram diminuídos após tratamento com a fração CFqb14, a enzima mieloperoxidase (MPO) encontra-se com atividade diminuída, sendo um indicativo de inibição da migração e ativação de neutrófilos (Fig. 36).

4.3.4. A fração FAI25-31ACN diminui o edema de orelha e a atividade de MPO

Outro modelo utilizado para a avaliação da atividade anti-inflamatória foi o edema de orelha induzido por óleo de cróton. Nesse estudo a atividade da fração FAI25-31ACN foi avaliada em duas vias de administração, pela via intraperitoneal e via tópica.

No experimento onde os animais foram tratados pela via intraperitoneal, tanto a dose de 20 mg/kg quando a dose de 10 mg/kg foram efetivas na redução da inflamação (Fig.37) causando a diminuição do edema em 73 e 67% respectivamente. Esse resultado endossa o resultado obtido no edema de pata, indicando mais uma vez a ação sistêmica dos componentes ativos.

Figura 37. Efeito da fração FAI25-31ACN via IP em edema de orelha induzido por óleo de cróton.

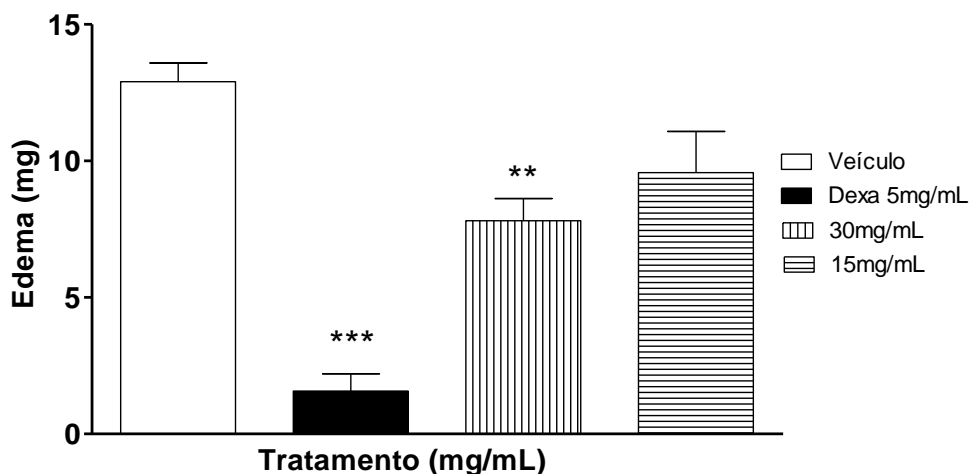


Valores representam média \pm SEM de n=8. ***p<0,001, diferença estatística com relação ao grupo veículo (One way ANOVA seguido de teste Tukey).

Já no tratamento realizado topicamente, apenas a maior concentração de 30 mg/mL diminuiu o edema efetivamente em 39% quando comparado ao grupo controle (Fig. 38). Além de ser um resultado coerente com o observado para o edema de pata, esses dados também corroboram a atividade antitumoral que foi observada em modelo de tumor de pata de Ehrlich

realizado por Monteiro (2012), uma vez que já é sabido que o ambiente tumoral gera um ambiente inflamatório que, de forma simbiótica, propicia a proliferação de células tumorais através do aumento de fatores proliferativos (Vendramini-Costa & Carvalho, 2012).

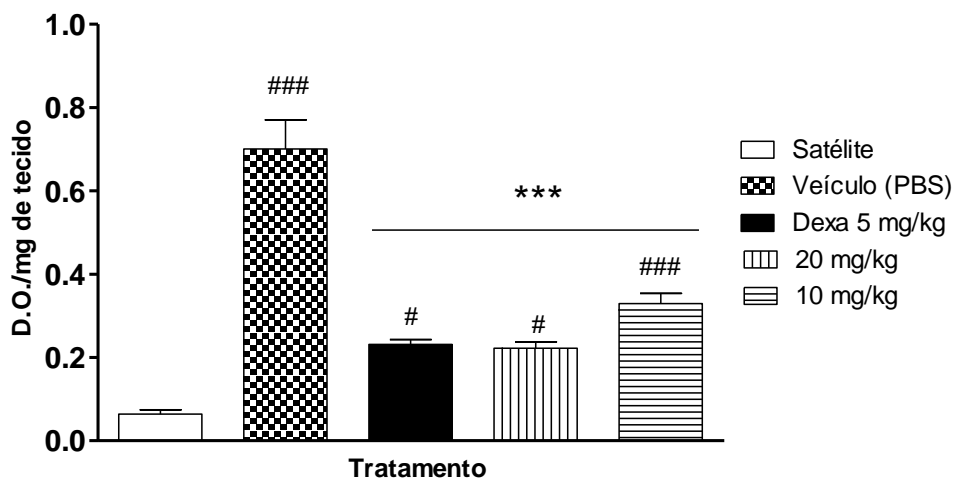
Figura 38. Efeito da fração FAI25-31ACN via tópica em edema de orelha induzido por óleo de cróton.



Valores representam média \pm SEM de $n=8$. ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$, diferença estatística com relação ao grupo veículo (*One way ANOVA* seguido de teste Tukey).

A fim de completar o estudo da inflamação nesse modelo, as orelhas foram coletadas para a avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase. De acordo com a figura 39 é possível verificar que o tratamento via IP com a fração FAI25-31ACN reduziu em 53% a atividade de MPO na dose de 10 mg/kg e em 67% com a dose de 20 mg/kg. Assim, tem-se uma indicação de que houve a inibição da ativação ou migração dos neutrófilos para a área edematosa.

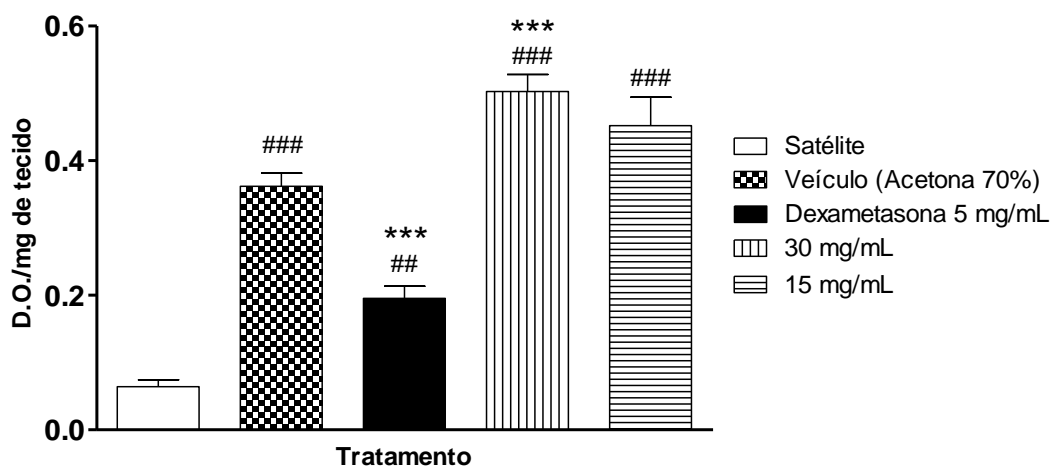
Figura 39. Dosagem de mieloperoxidase no modelo de edema de orelha induzida por óleo de cróton (*Croton tiglium* L.) em função do tratamento com FAI25-31ACN por via intraperitoneal.



Valores representam média ± SEM de n=8. ***p<0,001, diferença estatística com relação ao grupo veículo. #p<0,05 e ###p<0,001 diferença em relação ao grupo satélite (não inflamado) (One way ANOVA seguido de teste Tukey).

Contrariamente ao tratamento via IP, o tratamento tópico com a fração FAI25-31 na maior concentração, causou um aumento significativo da atividade da enzima MPO, ou seja, houve um maior recrutamento de neutrófilos para a área (Fig. 40). Isso pode ser um indicativo da ação irritante local, em contrapartida à sua ação anti-inflamatória sistêmica.

Figura 40. Dosagem de mieloperoxidase no modelo de edema de orelha induzida por óleo de cróton (*Croton tiglium* L.) em função do tratamento com FAI25-31ACN por via tópica.



Valores representam média ± SEM de n=8. ***p<0,001, diferença estatística com relação ao grupo veículo. ##p<0,01 e ###p<0,001 diferença em relação ao grupo satélite (não inflamado) (One way ANOVA seguido de teste Tukey).

O ácido gálico, componente majoritário das frações em estudo, além de sua atividade antitumoral também apresenta ação anti-inflamatória (Pandurangan et al., 2015a; Tsang et al., 2016; BenSaad et al., 2017; Thamsermsang et al., 2017). Dessa maneira, assim como a atividade antitumoral das frações FAI25-31ACN e FAIII6-8, a atividade anti-inflamatória pode estar relacionada à presença desse constituinte.

5. Conclusão

As frações ativas de *Croton campestris* A.St.-Hil. apresentaram atividade antiproliferativa *in vitro* em cultura de células tumorais humanas e *in vivo* em modelos experimentais de tumor sólido de Ehrlich e de atividade anti-inflamatória. As frações FAI25-31ACN e FAIII6-8 apresentaram componentes já descritos para o gênero *Croton*, sendo seu componente majoritário o ácido gálico, dado esse, descrito pela primeira vez nessa espécie. Portanto, os dados obtidos endossaram a continuidade do trabalho a fim de aprofundar os estudos para elucidação dos mecanismos envolvidos na atividade biológica observada.

CAPÍTULO 2

Avaliação da ação antiproliferativa e vias celulares envolvidas frente ao tratamento de células tumorais de pulmão humano com a fração FAIII6-8 obtida de Croton campestris A.St.-Hil e sua atividade antitumoral in vivo

CAPÍTULO 2

Resumo

Devido ao aumento da expectativa de vida, aos hábitos alimentares modernos e à exposição cada vez maior à carcinógenos, o câncer é uma doença cujo número de vítimas aumenta a cada ano. Dentre os tipos mais agressivos, o câncer de pulmão é um dos que apresenta os piores índices de sobrevida. Em 2012, uma pesquisa apontou para a incidência de 1,8 milhões de casos novos de câncer de pulmão, ou seja, 12,9% de todos os novos casos de câncer (14 milhões), com 1,6 milhões de óbitos, quase 20% do total de casos. Nesse contexto, a busca por novas substâncias a partir de fontes naturais é uma das abordagens na procura por novos tratamentos de diversos cânceres, inclusive o câncer de pulmão. Portanto, baseado nos resultados prévios que apontam efetiva atividade antiproliferativa sobre a linhagem de pulmão NCI-H460, o objetivo desse trabalho foi aprofundar o estudo da ação da fração FAIII6-8 de *Croton campestris* A.St.-Hil sobre essa linhagem, investigando os mecanismos de morte celular envolvidos através de análises por citometria de fluxo e expressão de proteínas por *western blot*. Além disso, a atividade da fração também foi avaliada *in vivo* utilizando a linhagem de tumor murino LLC (*Lewis Lung Carcinoma*) em modelo de tumor sólido no flanko. Assim, os dados obtidos mostraram que as frações ativas levam à parada do ciclo celular em G1 com 24 horas de tratamento, mostrando citotoxicidade. Além disso, houve perda de seletividade de membrana já com 3 horas de tratamento, porém, sem a marcação exclusiva por anexina, além de não ter sido observada a ativação de caspases, indicando morte celular não apoptótica. O tratamento também causou perda de potencial de membrana mitocondrial e aumento na produção de ROS. Esses fatores podem ter contribuído com a ativação de vias celulares envolvidos na necroptose, uma vez que foi observado o envolvimento de JNK e RIP1. O tratamento *in vivo* também foi efetivo, inibindo o crescimento tumoral. Assim, tomados em conjunto, os dados obtidos apontam que *Croton campestris* apresenta potencial ação antitumoral e que os mecanismos indutores de morte superpujam a sobrevivência de células tumorais de pulmão. Além disso, *Croton campestris* apresenta atividade antitumoral *in vivo* em modelo de carcinoma murino de pulmão.



1. Introdução

O câncer é definitivamente um grande problema de saúde pública. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, o câncer representa 63% das mortes no mundo, sendo sua incidência afetada por aspectos demográficos, idade populacional, hábitos alimentares e fatores ambientais (Monteiro et al., 2014). São previstos cerca de 20 milhões de novos casos no mundo para 2025 (IARC, 2017). Na última estimativa de 2012, os tipos de câncer mais incidentes no mundo foram pulmão (1,8 milhão), mama (1,7 milhão), intestino (1,4 milhão) e próstata (1,1 milhão). Nos homens, os mais frequentes foram pulmão (16,7%), próstata (15,0%), intestino (10,0%), estômago (8,5%) e fígado (7,5%). Em mulheres, as maiores frequências encontradas foram mama (25,2%), intestino (9,2%), pulmão (8,7%), colo do útero (7,9%) e estômago (4,8%) (IARC, 2012; Torre et al., 2016a).

No Brasil, a estimativa para o biênio 2016-2017 aponta a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer, sendo 180 mil novos casos de melanoma. Dos casos restantes, em homens, os novos casos de câncer serão principalmente de próstata (28,6%), pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6,0%) e cavidade oral (5,2%). E, nas mulheres, os cânceres de mama (28,1%), intestino (8,6%), colo do útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%) estarão entre os principais (INCA, 2017).

Dentre os cânceres mais comuns, apresentando um aumento de 2% em sua incidência mundial a cada ano, o câncer de pulmão é um dos tipos de câncer mais agressivos já que sua razão mortalidade/incidência é cerca de 90%. Em cinco anos, a sobrevida é baixa, ficando na faixa de 13 e 21% em países desenvolvidos e entre 7 e 10% nos países em desenvolvimento, pois geralmente esse tipo de câncer é detectado em estágios mais avançados, uma vez que nos estágios iniciais não são observados sintomas claros. A última estimativa mundial de 2012 apontou uma incidência de 1,8 milhões de casos novos de câncer de pulmão, ou seja, 12,9% de todos os novos casos de câncer, com 1,6 milhões de óbitos (19,4%) (Ferlay et al., 2015; Torre et al., 2016b). No Brasil, em 2016, estima-se ter havido 17.330 de casos novos de câncer de traqueia, brônquios e pulmões entre homens e 10.890 entre mulheres (Tab.1) (INCA, 2015).

Tabela 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 no Brasil. Dados distribuídos por sexo, exceto tumor de pele não melanoma (INCA, 2016).

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%			Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

No fim do século XX, o câncer de pulmão se tornou uma das principais causas de morte evitáveis. E, apesar do fumo ser o responsável por mais de 80% dos casos de câncer de pulmão, outros fatores de risco também devem ser considerados, como a exposição a carcinógenos especialmente relacionados aos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, metais e à poluição do ar relacionada principalmente à exaustão de motor a diesel. Fatores patológicos como infecções pulmonares reincidentes, tuberculose, deficiência e excesso de vitamina A também são considerados para o desenvolvimento do tumor de pulmão (Jemal et al., 2008; Lee et al., 2016).

Tradicionalmente, o câncer de pulmão é classificado em dois grupos: os carcinomas de células pequenas (*small-cell lung cancer* – SCLC) e o carcinoma de células não pequenas (*non-small-cell lung cancer* – NSCLC). Com o avanço das ferramentas genômicas, o câncer de pulmão deixou de ser visto como uma doença única e tem sido dividido em subtipos moleculares que determinam o alvo terapêutico e as estratégias quimioterapêuticas a serem empregadas caso a caso (West et al., 2012; Hensing et al., 2014; Monteiro et al., 2014). O grupo do carcinoma de células não pequenas, que representa 80% dos casos de câncer de pulmão, inclui o adenocarcinoma, o carcinoma de células escamosas e o carcinoma de grandes células (Cooper & Spiro, 2006). Os adenocarcinomas apresentam mutações envolvendo genes que impactam diretamente nas vias de sobrevivência e proliferação celular como os genes da família do EGFR (receptor de fator de crescimento epidérmico - *epidermal growth factor receptor*) e KRAS (homólogo do oncogene viral do *sarcoma de rato* v-Ki-ras2 *Kirsten* – *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), e também o gene ALK (receptor de tirosino quinase ALK - *anaplastic lymphoma kinase* ou *ALK tyrosine kinase receptor*). A atividade do EGFR contribui com o aumento do crescimento tumoral, invasão e metástase (Sasaki et al., 2013).

Semelhantemente, o oncogene KRAS está envolvido na regulação da divisão celular e, portanto, mutações nesse gene levam à transformação celular e aumento da resistência à quimioterapia e às terapias que tem como alvo os receptores EGFR (Jančík et al., 2010; Fraile et al., 2017). Por sua vez, alterações no gene de ALK estão relacionadas à eventos moleculares tumorigênicos que aparecem em diversos tipos tumorais (Grande et al., 2011). Os cânceres de células pequenas expressam marcadores neuroendócrinos e podem apresentar mutações em TP53 (proteína p53 - *protein p53*) e RB1 (proteína retinoblastoma - *retinoblastoma protein*) (Salgia et al., 2011; Monteiro et al., 2014). Na verdade, já é bem estabelecido o papel da proteína P53, que está mutada em mais de 50% dos tipos de cânceres. Agindo como fator de transcrição, ela atua impedindo a continuidade da divisão celular em células alteradas, como por exemplo, apresentando uma aberração genética. Assim, mutações nesse gene podem levar à uma transformação celular maligna, progressão histológica, invasão e metástase (Gibbons et al., 2014). Com papel referente ao mesmo tema, a proteína RB participa de uma variedade de processos relevantes ao DNA, como a transcrição, replicação e reparo do DNA, sendo essencial na regulação do ciclo celular (Chinnam & Goodrich, 2011).

O câncer de pulmão, por se tratar de uma doença com desordens genéticas heterogêneas, tem tido diversas abordagens moleculares em voga (Rosell & Karachaliou, 2015). Muitas estratégias têm sido estudadas para a quimioprevenção e o tratamento dessa neoplasia, incluindo inibição da via STAT3 (transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 - *signal transducer and activator of transcription 3*), parada do ciclo celular, silenciamento de hTERT (telomerase transcriptase reversa humana - *human telomerase reverse transcriptase*), modulação de miRNA (micro RNA), supressão de iNOS (isoforma do óxido nítrico sintetase - *nitric oxide synthase isoform*), inibição de VEGFR-2/EGFR (receptor para fator de crescimento endotelial vascular 2/EGFR – *receptors for vascular fator epitelial growth fator 2/EGFR*) entre outros (Hespanhol, 2008; Greenberg et al., 2013). Esses moduladores são fundamentais na regulação da fisiologia celular normal. A STAT3, por exemplo, encontra-se superativada em diversos tipos de tumores humanos, atuando como oncogene no processo de tumorigênese (Iglesia et al., 2008). Já hTERT, como subunidade da enzima telomerase, quando tem sua atividade aumentada, contribui para a geração de células imortais. Esse tipo de alteração é bem caracterizado em tumores de pulmão, sendo que uma de suas implicações relaciona-se com a evasão de processos apoptóticos e imortalidade celular (Mocellin et al., 2012; Bonomi et al., 2014).

Além disso, alguns biomarcadores também têm sido o foco de estudos de potenciais alvos terapêuticos do tratamento do câncer de pulmão como EGFR, K-ras, ALK,

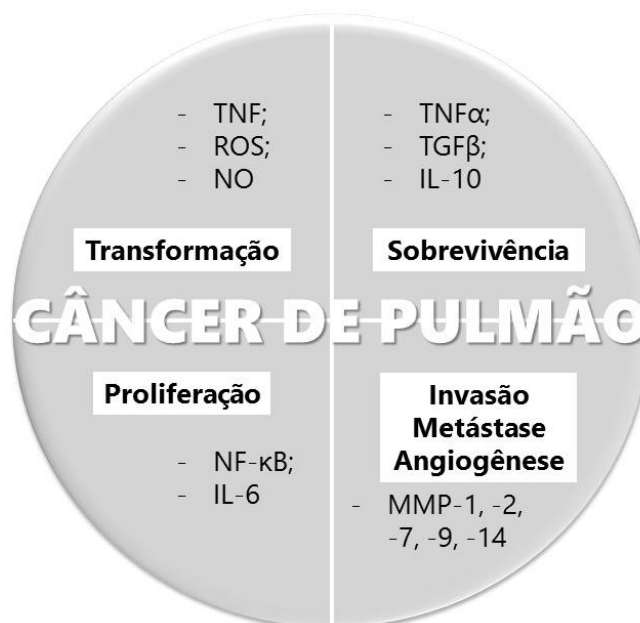
MET (proteína tirosino quinase Met - *tyrosine-protein kinase Met*), CBL (linfoma casitas da linhagem B - *Casitas B-lineage Lymphoma*) e COX2 (ciclooxygenase 2 – *cyclooxygenase 2*) (Shaw et al., 2014). A inibição de COX2 e, consequentemente, da síntese de prostaglandinas (PGE2), favorece a supressão da tumorigênese e está diretamente relacionada à mecanismos inflamatórios (Mao et al., 2005).

A inflamação é um dos mais importantes estímulos do microambiente tumoral durante a carcinogênese e sua relação íntima com processos neoplásicos vem se tornando cada vez mais alvo de estudos. Categorizada como um *hallmark* do câncer, cerca de 20 % dos cânceres estão ligados as infecções crônicas, 30 % são atribuídos ao fumo e poluentes inalados, e 35% à fatores alimentares (Mantovani et al., 2008; Aggarwal et al., 2009; Hanahan & Weinberg, 2011; Vendramini-Costa et al., 2017).

Nesse contexto, sabe-se que o pulmão pode ser um sítio de lesões inflamatórias crônicas ou repetitivas, tanto pelo fumo quanto por infecções como tuberculose, pneumonia bacteriana e outras doenças pulmonares inflamatórias (Mantovani et al., 2008; Perlikos et al., 2013). Além disso, células tumorais produzem citocinas e quimiocinas que, por atraírem leucócitos e contribuírem com o cenário inflamatório, influenciam nas vias que levam à tumorigênese. Diferentes tipos de câncer, incluindo câncer de pulmão (Fig. 1), apresentam aumento sérico de interleucinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 e IL-18 (Azevedo et al. 2011; Gomes et al., 2014).

Outro mediador relacionado ao crescimento e proliferação celular é o NF- κ B. Chen e colaboradores (2011) apresentam que altos níveis de ativação de NF- κ B, tanto em SCLC quanto em NSCLC, estão associados à evolução do câncer de pulmão e indicam um prognóstico ruim da doença. Seu papel crítico no desenvolvimento desta patologia sugere o NF- κ B como um alvo para a quimioprevenção do avanço do tumor de pulmão (Chen et al. 2011). Estudos apontam que agentes como anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) que atuam na inibição do tumor de pulmão possuem atividade inibitória sobre a via do NF- κ B (Cuzick et al. 2009).

Figura 1. Visão geral do papel de moléculas inflamatórias no desenvolvimento do câncer de pulmão.



Fonte: Adaptado de Gomes et al., 2014.

Corroborando as análises do *link* câncer-inflamação, estudos apontam o papel positivo na redução do risco relativo de tumores como o de pulmão através do uso de AINEs, como por exemplo, a aspirina. Além disso, estudos mostram a redução do número de tumores de pulmão em animais tratados com anti-inflamatórios (Zhan et al. 2013; Gomes et al., 2014). Assim, a combinação de agentes antitumorais e anti-inflamatórios emerge como uma estratégia no tratamento e até mesmo na prevenção de tumores como o de pulmão no qual o ambiente inflamatório apresenta pivotante papel em sua evolução.

Outra característica que também é um *hallmark* é a capacidade que as células tumorais possuem de ignorar os sinais externos e internos que regulam a proliferação celular, tendendo a evitar os processos de apoptose e diferenciação (Hanahan & Weinberg, 2011). Sendo assim, substâncias que foquem seus mecanismos de ação em vias não apoptóticas podem oferecer uma estratégia vantajosa no tratamento do câncer.

Nesse contexto, um tipo de morte celular que vem sendo estudado mais recentemente é a necroptose, onde os processos são mediados por sinalizadores que levam a morte celular programada. Essa via de morte pode ser desencadeada por receptores de morte, como o fator de necrose tumoral (TNF), que requer a atividade de proteínas quinase de interação com receptor (RIP1 e RIP3) (Galluzzi & Kroemer, 2008; Vandenabeele et al., 2010).

Portanto, novos agentes que provoquem uma indução de morte celular por vias não

clássicas e que tragam a atividade anti-inflamatória como uma de suas ações, somam características quimioterápicas promissoras dentro da busca por novas estratégias no tratamento do câncer. Assim, a busca por novas substâncias a partir de fontes naturais pode alavancar a descrição de potenciais compostos antitumorais (Newman & Cragg, 2012; Monteiro et al., 2014). Nesse contexto, e baseado no histórico de seletividade das frações ativas por células de tumor de pulmão humano NCI-H460 (Monteiro, 2012), esse trabalho buscou a elucidação das vias celulares envolvidas e a sugestão do possível mecanismo de ação das substâncias antitumorais de *Croton campestris* A.St.-Hil no contexto do câncer de pulmão.

2. Objetivo

O principal objetivo desse estudo foi a elucidação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade antiproliferativa da fração FAIII6-8 obtida de *Croton campestris* A.St.-Hil. sobre linhagem tumoral de pulmão humano bem como avaliação de sua atividade antiproliferativa *in vivo*.

2.1. Objetivos específicos

- Elucidar o tipo de morte celular induzido pela fração FAIII6-8 na linhagem de pulmão NCI-H460;
- Investigar a influência do tratamento com a fração FAIII6-8 no ciclo celular;
- Analisar alterações celulares e moleculares envolvidas como a produção de ROS e outros elementos oxidantes;
- Investigar o possível dano mitocondrial e suas consequências;
- Avaliar a expressão de proteínas relacionadas à eventos de morte celular e vias correlacionadas à fatores inflamatórios;
- Avaliar o potencial terapêutico da fração FAIII6-8 em modelo de tumor subcutâneo utilizando linhagem de tumor de pulmão murino LLC, a fim de comprovar sua atividade *in vivo*.

3. Material e métodos

3.1. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica bem estabelecida, refinada, versátil e acessível que vem sendo amplamente utilizada com fins de diagnóstico clínico e também na pesquisa científica. Na citometria de fluxo as células ou partículas são alinhadas em fluxo de forma que possam ser analisadas individualmente. Através da detecção de sinais decorrentes da incidência de um feixe de luz (*laser*), os dados obtidos são detectados e convertidos em sinais digitais que podem ser usados para avaliar a morfologia celular, expressão de proteínas de superfície ou intracelular, expressão gênica e fisiologia celular (Ibrahin & Van den Engh, 2007).

As análises de citometria de fluxo foram realizadas no citômetro Guava EasyCite™MiniSystem Millipore® (FAPESP 09/51602-5). As amostras foram diluídas em DMSO (dimetilsulfóxido) e, portanto, os controles negativos receberam esse diluente no volume máximo correspondente ao usado para as células tratadas, ou seja, cerca de 0,1% de DMSO.

3.1.1. Avaliação do Ciclo celular

Através da utilização de um intercalante de DNA, o Iodeto de propídio (PI), é possível avaliar o número de células em cada etapa do ciclo celular. Assim, células na fase G₀/G₁ contêm duas cópias dos cromossomos, ou seja, apresentam ploidia típica ($2n=2c$) de células que ainda não entraram em mitose. Quando as células entram em processo de divisão celular e iniciam a síntese de material genético (fase S), a quantidade de DNA é maior ($>2c$), levando à maior intensidade de marcação. E por fim, as células já duplicadas ($4c$) e prestes a passar pela citocinese (fase G₂/M), apresentam o dobro de fluorescência quando comparadas à população G₀/G₁.

Células NCI-H460 foram inoculadas em placas de 6 compartimentos numa densidade de inoculação de 4×10^4 cel/mL em meio RPMI com 5% de soro fetal bovino (SFB) e penicilina-estreptomicina (2 mg/L) e mantidas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Após 24 horas de incubação, o meio de cultura completo foi substituído por meio de cultura sem SFB para o carenciamento, ou seja, para a sincronização das células para o início do ciclo celular. Após 24 horas de carenciamento as células receberam suplemento de SFB novamente e foram tratadas com a fração FAIII6-8 nas concentrações 5 e 25 µg/mL em triplicata por 24 horas. Como controle positivo, foi utilizado Colchicina (10 µg/mL), substância

conhecida por inibir a despolimerização dos microtúbulos, o que causa parada do ciclo em G₂/M.

Após o tratamento as células foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi removido, o precipitado foi ressuspensionado em 500 µL de PBS e centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em PBS. Essa solução celular foi gentilmente adicionada a outro microtubo já contendo 500 µL de etanol 70% a 4°C. A fim de fixar essas células, o microtubo foi homogeneizado lentamente e mantido a 4°C por no mínimo 12 horas antes do procedimento de marcação. Essas amostras já fixadas podem ser mantidas por semanas a 4°C ou a -20°C de 2 a 3 meses, mas o ideal é fazer a marcação e a leitura no dia seguinte à fixação.

Após a fixação, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 500 µL de PBS, a fim de retirar todo o etanol. Seguindo as instruções do fabricante, o precipitado celular foi ressuspensionado em 200 µL do reagente *Guava® Cell cycle*, as amostras foram incubadas por 30 minutos, protegidas da luz e a seguir analisadas por citometria de fluxo (5000 eventos).

3.1.2. Avaliação da Morte celular

Um dos testes utilizados para verificar a morte celular por apoptose é a avaliação da externalização de um fosfolipídio de membrana, a fosfatidilserina. Esse fosfolipídio, naturalmente localizado na face citoplasmática da membrana, é lançado para a camada externa da membrana celular. Essa sinalização indica ao sistema fagocitário, por exemplo, que a célula entrou em processo de morte por apoptose e que deve ser eliminada. Para tal, a anexina V é uma proteína com elevada afinidade por fosfatidilserina, que a reconhecerá desde que esteja na face exterior da membrana celular. Assim, a anexina V conjugada à ficoeritrina (PE), marca as células em apoptose inicial. Já o 7-amino-actinomicina D (7-AAD) é uma substância intercalante de DNA da célula e atua como um indicador de integridade estrutural de membrana, não sendo capaz de marcar células viáveis e em apoptose inicial. Portanto, células 7-AAD positivas indicam células em processo tardio de morte ou categorizadas como células necróticas.

Células NCI-H460 foram inoculadas em placas de 12 compartimentos numa densidade de inoculação de 4×10^4 cel/mL em meio RPMI com 5% de SFB e penicilina-estreptomicina (2 mg/L), mantidas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Após 24 horas de estabilização, as células foram tratadas com a fração FAIII6-8 em triplicata (5 e 25 µg/mL) por 3, 6, 12 e 24 horas.

Em seguida, as células foram gentilmente tripsinizadas e 100 µL da solução celular foram transferidos para um microtubo ao qual foram adicionados 100 µL do reagente *Guava®Nexin*, seguindo as instruções do fabricante. Após 20 minutos de incubação, à temperatura ambiente e protegidas da luz, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo (2000 eventos).

3.1.3. Ativação de caspases

Como a verificação da externalização de fosfatidilserina não é considerada definitiva para avaliar o envolvimento ou não de morte apoptótica, podemos confirmar esse evento através da investigação da ativação de caspases. Essas enzimas fazem parte de uma família de cisteína-proteases que atua em cascata e leva a uma série de eventos que têm como resultado a morte celular. Esses eventos podem ser desencadeados por fatores externos (via extrínseca), que envolve interações mediadas por receptores de membrana. Isso pode resultar na ativação catalítica de procaspase-8, que ativada, direcionará os eventos celulares para a fase executora da apoptose. No caso da via intrínseca, eventos mitocondriais levam à ativação da caspase-9, que levará à cascata de eventos apoptóticos. A etapa final de ambas as vias é a ativação das caspases executoras (3, 6 e 7), ou seja, a fase final da apoptose onde ocorre a ativação de enzimas que irão degradar o material nuclear e proteínas do citoesqueleto (Fulda & Debatin, 2006; Elmore, 2007). O inibidor de caspase conjugado à fluorocromo SR-VAD-FMK (*sulforhodamine-valyl-alanyl-aspartyl-fluoromethyl-ketone*) é capaz de permear as células sem causar toxicidade. Uma vez dentro das células, ele se liga covalentemente e de forma irreversível às múltiplas caspases ativadas. No caso de caspases ativadas, o marcador não sai no processo de lavagem, o que resultará em sinal vermelho fluorescente proporcional à quantidade de enzimas ativadas presentes nas células (Sinclair et al., 2013).

Células NCI-H460 foram inoculadas em placas de 12 compartimentos numa densidade de inoculação de 4×10^4 cel/mL/poço em meio RPMI com 5% de SFB e penicilina-estreptomicina (2 mg/L), mantidas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Após 24 horas de estabilização, as células foram tratadas com a fração FAIII6-8 em triplicata (5 e 25 µg/mL) por 24 horas.

De acordo com as instruções do fabricante, as células foram tripsinizadas e 100 µL da solução celular foram transferidos para um microtubo ao qual foram adicionados 10 µL da solução de trabalho do kit *Guava®Multicaspase SR Kit*. As células foram incubadas por 1 hora em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido e, na sequência, foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos e lavadas com o tampão fornecido pelo kit. Em seguida,

foram adicionados a cada microtubo, 200 µL da solução de 7-AAD fornecida pelo fabricante e, após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente e protegidas da luz, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo (2000 eventos).

3.1.4. Avaliação da produção de ROS através de DCFH-DA

O diacetato de 2,7- diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) é um corante que, intracelularmente, é convertido em seu derivado polar 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCFH), que não apresenta fluorescência. No entanto, quando oxidado por ROS intracelulares e outros peróxidos, o DCFH é convertido em 2,7-diclorofluoresceína, que é altamente fluorescente. Dessa forma, a intensidade da fluorescência observada será proporcional à concentração de ROS intracelular (Rastogi et al., 2010; Longato et al., 2015).

Células NCI-H460 foram inoculadas em placas de 6 compartimentos numa densidade de inoculação de 4×10^4 cel/mL em meio RPMI com 5% de SFB e penicilina-estreptomicina (2 mg/L), mantidas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Após 24 horas de estabilização, as células foram tratadas com 25 µg/mL da fração FAIII6-8 em triplicata por 30, 60, 120 e 180 minutos.

As células foram tripsinizadas gentilmente, centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos e lavadas com tampão Hank's. As amostras foram incubadas por 30 minutos com DCFH-DA a 10 µM no escuro em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Após homogeneização das amostras, as mesmas foram analisadas em citômetro de fluxo (2000 eventos).

3.1.5. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

A alteração da integridade de membrana mitocondrial é uma característica de diversos tipos de morte celular. Uma forma de verificar sua integridade é a avaliação do seu potencial de membrana. Nesse sentido, a rodamina (Rho 123) é um corante fluorescente catiônico permeável à membrana citoplasmática que é rapidamente sequestrado pelas mitocôndrias. Assim, alterações no potencial transmembrânico levam à saída de rho 123 da mitocôndria, o que leva à redução da intensidade de fluorescência (Peres & Curi, 2005).

As células NCI-H460 foram inoculadas em placas de 6 compartimentos numa densidade de inoculação de 4×10^4 cel/mL em meio RPMI com 5% de SFB e penicilina-estreptomicina (2 mg/L) e mantidas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Após 24 horas de estabilização, as células foram tratadas com 25 µg/mL da fração FAIII6-8 em triplicata por 30, 60, 120 e 180 minutos.

Após o tratamento, foi adicionado 1 μL de Rho123 (Sigma[®]) em cada poço e incubou-se por 15 minutos no escuro em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Na sequência, as células foram tripsinizadas e lavadas com PBS e analisadas em citômetro de fluxo (2000 eventos).

3.1.6. Avaliação do estresse mitocondrial pela produção de ânions superóxidos

Dentre diversos papéis na fisiologia celular, a mitocôndria é a principal fonte de espécies reativas de oxigênio (ROS) que são produzidos principalmente durante o processo de fosforilação oxidativa. Nesse processo, elétrons sobressalentes podem reagir com o oxigênio molecular e produzir espécies parcialmente reduzidas como o superóxido. Essa e outras ROS podem levar ao estresse oxidativo que danifica estruturas e interfere em processos celulares, levando ao envelhecimento ou morte celular (Lambert & Brand, 2009). Por isso, a avaliação da geração de ânions superóxido (O₂⁻) foi feita com a utilização do *Guava[®]Mitosox Red*, uma sonda fluorescente derivada da hidroetidina acoplada à cátion ligante específico de ROS da matriz mitocondrial (Longato et al., 2015).

Células NCI-H460 foram inoculadas em placas de 6 compartimentos numa densidade de inoculação de 4x10⁴ cel/mL em meio RPMI com 5% de SFB e penicilina-estreptomicina (2 mg/L) e mantidas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Após 24 horas de estabilização, as células foram tratadas com 25 $\mu\text{g/mL}$ da fração FAIII6-8 em triplicata por 3 horas.

Em seguida, as células foram tripsinizadas gentilmente, centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos e lavadas com o tampão fornecido pelo kit. O precipitado foi ressuspenso em 100 μL da solução de trabalho do kit (1:50 *Mitosox Red Reagente* em tampão) e as amostras foram incubadas por 15 minutos em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Na sequência, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo (2000 eventos).

3.2. Avaliação da expressão proteica por western blot (WB)

A fim de detectar proteínas em um homogenato de células ou tecido, o *western blot* utiliza a eletroforese em gel para separar as proteínas por peso molecular. Depois de serem transferidas para uma membrana de nitrocelulose, pode-se examinar quali e semiquantitativamente a presença de proteínas através da utilização de anticorpos específicos.

Em colaboração com a pesquisadora Dra. Karin J. Pelizzaro Rocha-Brito do Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual do Instituto de Biologia da Unicamp, foi avaliada a expressão de proteínas associadas a vias de sobrevivência das células NCI-H460

após o tratamento com a fração FAIII6-8. Em placas de Petri de 60 mm de diâmetro, foram incubadas 2×10^6 células em estufa úmida à 37°C e 5% de CO₂ e, após 24 horas, as células foram tratadas com 25 ou 50 µg/mL da FAIII6-8 por 3, 6, 12 e 24 horas.

Depois dos tempos de tratamento, as células foram lavadas três vezes com solução salina gelada (NaCl 0,9%) e, com auxílio de um raspador, as células foram recolhidas e transferidas para um tubo falcon e centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos a 4°C. Após o descarte do sobrenadante, foi adicionado 100 µL de tampão de lise (50 mM Tris -HCl [pH 7,4], 1% Tween 20, 0,25% deoxicolato de sódio, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM O-Vanadato, 1 mM NaF) contendo inibidor de proteases (0,01%, coquetel p2714, Sigma®) e as amostras foram sonicadas por 2 ciclos de 10 segundos cada. Na sequência, foram mantidas em gelo por 40 minutos, sendo homogeneizadas em vórtex a cada 15 minutos a fim de aumentar a eficiência de extração de proteínas. Depois, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C e procedeu-se a coleta do sobrenadante e a quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford utilizando kit comercial (Sigma®) e albumina (BSA) como padrão. Após a dosagem de proteínas as amostras foram acrescidas de tampão na proporção 1:1 [Tris-HCl 100 mM (pH 6,8), DTT 200 mM, SDS 4%, azul de bromofenol 0,1 % e glicerol 20%]. A seguir, as amostras foram fervidas por 5 minutos e 40 µg de proteína de cada amostra foram aplicados em gel de poliacrilamida (8 - 12%) contendo SDS (SDS-PAGE).

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF) (previamente ativadas com metanol) na presença de 20% de metanol e 0,02% de SDS durante 1 hora e 30 minutos, para proteínas de baixo peso molecular, e 4 horas para proteínas de alto peso molecular, em amperagem constante de 400 mA. As membranas foram bloqueadas com BSA a 5% preparado em tampão Tris contendo tween 20 a 0,05% (TBST) e incubadas *overnight* com anticorpos primários diluídos 1:1000 em BSA 3%. Em seguida, as membranas foram lavadas com TBST (3X por 5 minutos) e incubadas com anticorpo secundário específico conjugado com peroxidase-HRP (1:10000) por 1 hora e 30 minutos. Após lavagem das membranas com TBST (3X por 5 minutos), as bandas foram detectadas por quimioluminescência no equipamento ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Science). A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria com o auxílio do programa Image J. Os valores resultantes foram corrigidos pelo valor obtido para o controle interno (gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase - GAPDH) correspondente a cada banda. As intensidades finais foram expressas relativamente ao controle DMSO 0,1% e como Unidades Arbitrárias (u.a.).

3.3. Avaliação da atividade antitumoral da fração FAIII6-8 sobre o carcinoma pulmonar de Lewis (LLC), tumor sólido de pulmão murino

Essa parte do estudo foi realizada sob supervisão do Dr. Sergei Grivennikov do programa *Cancer Prevention and Control* no *Fox Chase Cancer Center* (Philadelphia-PA, EUA). Os experimentos foram realizados em camundongos C56BL6 machos (8 semanas de idade), obtidos e mantidos no biotério da instituição sob condições controladas ($22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ em ciclos de 12 horas claro/escuro com livre acesso à ração e água). Os protocolos de manutenção, pesquisa e eutanásia dos animais estão de acordo com os princípios e métodos adotados pelo *National Institutes of Health* (NIH) e foram aprovados pelo comitê de ética em pesquisa com animais do *Fox Chase Cancer Center*.

Considerando o histórico de resultados positivos de seletividade para a linhagem celular de tumor humano NCI-H460, optou-se por fazer uma avaliação *in vivo* de atividade sobre um tumor sólido oriundo de um tumor de pulmão. As células LLC representam uma linhagem celular estabelecida a partir do pulmão de um camundongo C57BL com um tumor resultante da implantação de carcinoma pulmonar primário de Lewis (Kellar et al., 2015). Assim, com o objetivo de avaliar a atividade antitumoral da FAIII6-8 sobre células de tumor de pulmão murino, as células da linhagem LLC (*Lewis Lung Carcinoma*) obtidas do ATCC foram injetadas (2×10^6 cél/animal) no subcutâneo de camundongos macho C57BL6. Após 3 dias, com os tumores já palpáveis, os animais foram divididos em 3 grupos de 7 animais cada: veículo (PBS), 2,5 e 5 mg/kg de fração FAIII6-8. O tratamento foi feito via intraperitoneal a cada três dias, assim como a medida dos tumores com a utilização do paquímetro e da seguinte fórmula baseada em Wong e colaboradores (2012), que estabeleceu o volume tumoral:

$$\text{Volume tumoral}_{(\text{mm}^3)} = \frac{(\text{Diâmetro A} \times \text{Diâmetro B}^2)}{2}$$

Sendo que, diâmetro A representa a maior medida e, por conseguinte, diâmetro B é a menor medida.

O experimento foi finalizado em 14 dias, permitindo que os tumores atingissem o máximo de volume sem ulcerações.

3.4. Análise dos dados

Os *softwares* GraphPad Prism 5[®] foram utilizados para a construção dos gráficos e para as análises estatísticas. Os resultados foram expressos da forma média \pm erro padrão. A diferença estatística entre os grupos foi avaliada por *one-way* ANOVA, seguido de teste de

Tukey. Valores com p menor ou igual a 0,05 foram considerados significativos. Quando não significativos matematicamente, os dados foram discutidos com base na tendência.

4. Resultados e discussão

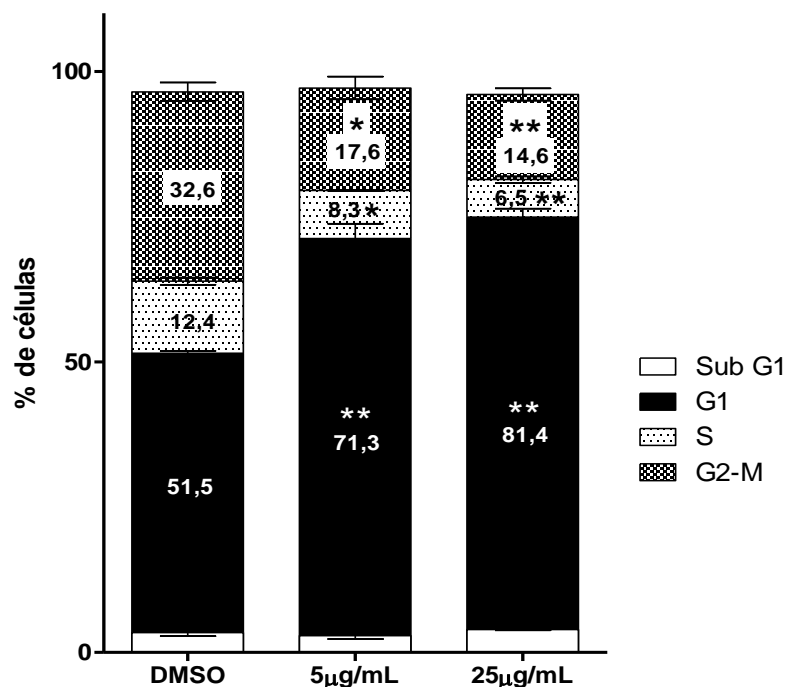
4.1. A fração FAIII6-8 causa parada do ciclo celular na fase G1 em células NCI-H460

Um tecido normal tem um complexo e cuidadoso controle sobre a produção e liberação de sinais promotores de proliferação e crescimento, que levam a entrada e a progressão do ciclo celular, garantindo assim a homeostase do número de células e manutenção da arquitetura e função tecidual (Mesquita et al., 2009). Quando as células perdem esse controle, pode surgir uma população celular alterada. Dessa maneira, de acordo com Hanahan e Weinberg (2011), tornam-se “mestres de seu próprio destino”, podendo vir a formar uma neoplasia que, quando maligna, caracteriza o câncer.

Dentre as características de células tumorais estão a inibição de sinais supressores de crescimento, resistência aos sinais de morte celular e a superexpressão de fatores que promovem a proliferação, favorecendo assim o crescimento tumoral sem reparos, acumulando mutações (Hanahan & Weinberg, 2011). Dessa forma, no processo de busca por agentes antitumorais, a avaliação da capacidade de indução de morte celular e/ou inibição de divisão celular por esse novo agente se faz necessária. Os resultados dos testes avaliando a atividade antiproliferativa das frações ativas indicaram seletividade para a linhagem NCI-H460. A fim de aprofundar estes estudos, foram realizados diversos experimentos focando nos diferentes mecanismos bioquímicos relacionados com a indução de morte celular.

Nesta primeira etapa, as células NCI-H460 foram expostas à 5 e 25 µg/mL da fração FAIII6-8 por 24 horas. A população controle apresentou 51,5% de células na fase G1 do ciclo celular, enquanto que 71,3 e 81,4% das células tratadas com 5 e 25 µg/mL respectivamente apresentaram-se nessa fase (Fig. 2). Foi também observada diminuição de células nas fases finais de multiplicação celular, ou seja, G2/M. Esses dados indicam que o tratamento com a fração ativa causa parada do ciclo em G1. As células situadas no pico hipodiplóide (Sub G1) apresentam conteúdo de DNA menor que 2c. Essa é uma indicação de aumento na ocorrência de *debris* celulares e DNA fragmentado, característicos de eventos de morte celular como a apoptose. No entanto, não foi observada diferença estatística nesse aspecto entre células das amostras controle e células tratadas.

Figura 2. Porcentagem das populações celulares NCI-H460 presentes em cada fase do ciclo após o tratamento de 24 horas com 5 e 25 $\mu\text{g/mL}$ da fração FAIII6-8 obtida de *Croton campestris*.



Valores representam média \pm SEM de $n=3$. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, diferença estatística com relação ao DMSO (One way ANOVA seguido de teste Tukey).

Outro fator importante relacionado a parada do ciclo em G1 é que esse fato previne que as células continuem para a fase S com a subsequente síntese de DNA, muitas vezes alterado, e conclua a divisão celular. A progressão da fase G1 é regulada pela ciclina D e ciclinas dependentes de quinase (CDK), que na fase G1 envolve participação de CDK4 e CDK6 e inibidores de CDKs como P21 e P27 (Huang et al., 2012). Sabemos que células cancerígenas proliferam descontroladamente desconsiderando os checkpoints do ciclo celular. Essas paradas de checagem são controladas pela proteína supressora tumoral P53, um fator de transcrição que controla a expressão de proteínas envolvidas na parada do ciclo celular, reparo de DNA, apoptose e senescência (Parrales & Iwakuma, 2016). Por isso, substâncias que bloqueiam o ciclo celular de células tumorais, prevenindo sua proliferação descontrolada podem ser promissoras como tratamento de neoplasias (Pereira et al. 2016).

Conforme descrito no capítulo 1 desse trabalho, os dados da fração FAIII6-8 sugerem o ácido gálico como componente majoritário. Conhecido por apresentar atividade citotóxica para certas linhagens celulares, seu mecanismo de ação ainda não foi completamente

elucidado (Tan et al., 2015). Em células promielocíticas HL60, derivados de ácido gálico causaram a parada do ciclo em G1 e em células Jurkat promoveram o aumento de células na fase G0/Sub G1 com morte celular consequente (Huang et al., 2012). Demiroglu-Zergeroglu e colaboradores (2016) também reportaram a parada do ciclo em G1 induzida por ácido gálico em células de mesotelioma. Em células HeLa o tratamento com ácido gálico causou parada do ciclo em G2/M através da desorganização centrossomal levando à catástrofe mitótica (Tan et al., 2015). Em linhagens de células tumorais de pulmão resistentes à inibidores de tirosino quinase (*tyrosine kinase inhibitor resistant* - TKIR) o ácido gálico também apresentou atividade anticâncer. Através da inibição de fosforilação de STAT3 e, consequentemente, diminuição da expressão de genes alvo dessa proteína, como Bcl2 e ciclina D, houve parada do ciclo e indução de apoptose (Phan et al., 2016).

Existem ainda inúmeras atividades biológicas relatadas para o ácido gálico e seus derivados (Ji et al., 2009; Yeh et al., 2011; Russell et al., 2012; Hu et al., 2013; Subramanian et al., 2016). No entanto, não há estudos sobre a ação de uma fração ou de extrato rico em ácido gálico em linhagem tumoral de pulmão NCI-H460. Assim, a parada do ciclo celular apresentada como um dos mecanismos de ação da fração FAIII6-8 é uma novidade.

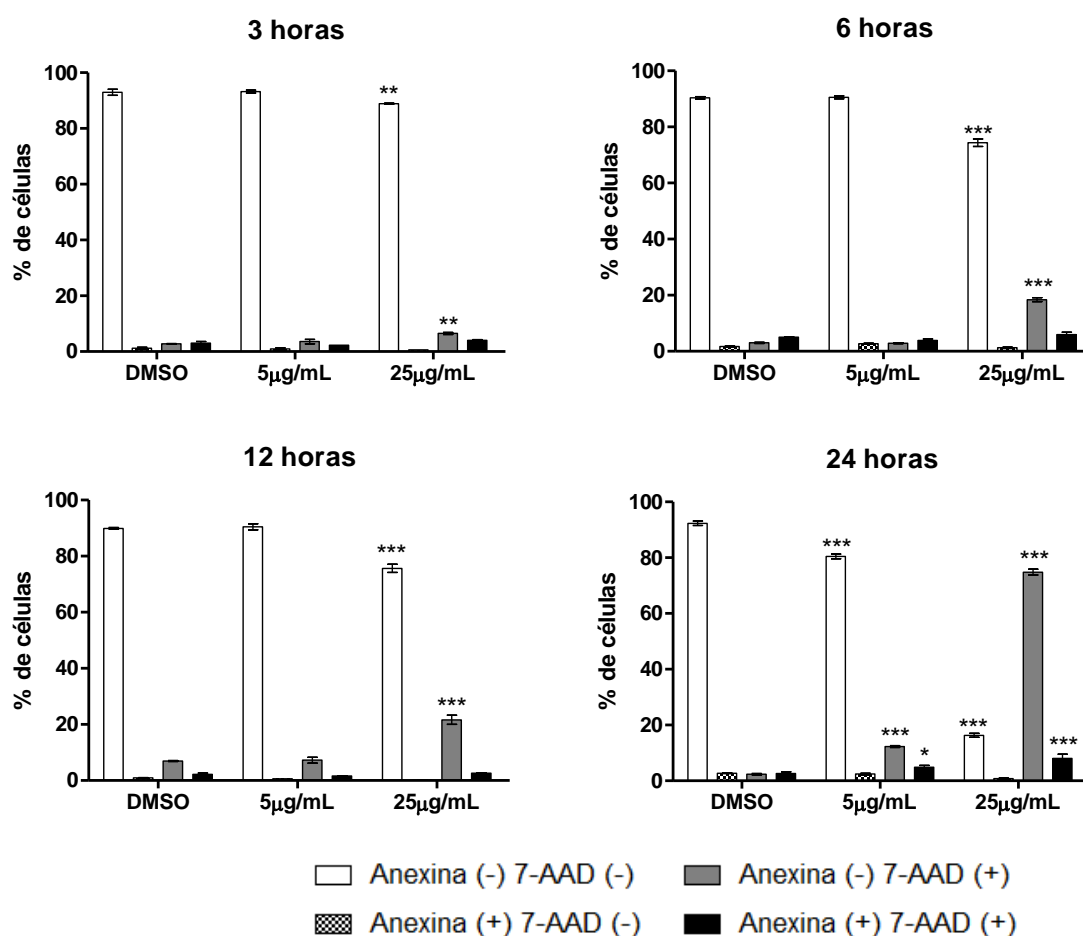
4.2. A fração FAIII6-8 causa perda de integridade de membrana e consequente marcação por 7-AAD em células NCI-H460, sem envolvimento da ativação de caspases

Na fase inicial da apoptose, a externalização da fosfatidilserina leva a ligação específica da anexina V. Já células duplamente marcadas, a chamada apoptose tardia, muitas vezes não indicam de forma segura a morte por apoptose, uma vez que essa marcação, já em estágios mais tardios, pode ser inespecífica e ocorrer devido à perda de integridade de membrana, o que ocorre também em outros tipos de morte. A marcação por 7-AAD, por avaliar a integridade estrutural de membrana, indica células em processo tardio de morte ou categorizadas como células necróticas. (Ouyang et al., 2012).

O tratamento com 25 µg/mL da fração FAIII6-8 promoveu significativa redução no número de células viáveis (duplamente negativas) já com apenas 3 horas de tratamento, chegando a apenas 16,3% de viabilidade no tempo de 24 horas (Fig. 3). Também no tempo de 3 horas já houve significativo aumento de células marcadas apenas com 7-AAD, chegando a 74,8% em 24 horas. Essa marcação indica morte celular não apoptótica e pode estar relacionada a outros processos de morte celular, como necrose ou necroptose. A concentração de 5 µg/mL da fração FAIII6-8 somente provocou morte celular após 24 horas de tratamento. Além disso, não houve marcação de apoptose inicial para nenhum tempo de tratamento e concentrações

estudadas e, levando em consideração os resultados obtidos anteriormente, sugere-se o não envolvimento de apoptose para células NCI-H460 tratadas com a fração FAIII6-8 (Monteiro, 2012).

Figura 3. Porcentagem de células NCI-H460 (pulmão) marcadas com anexina e/ou 7-AAD após tratamento de 3, 6, 12 e 24 horas com a fração FAIII6-8 de *Croton campestris* nas concentrações indicadas.

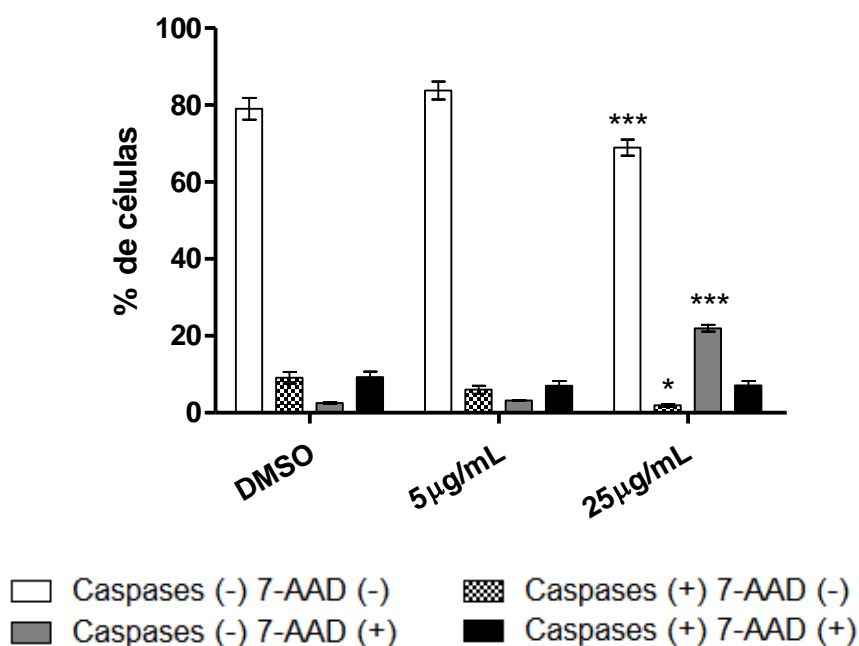


Valores representam média \pm SEM de $n=3$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, diferença estatística com relação ao DMSO (One way ANOVA seguido de teste Tukey).

A fim de confirmar a ausência de apoptose no processo de morte celular promovido pela fração FAIII6-8, avaliou-se a ativação de caspases. Como podemos ver na figura 4, após 24 horas de tratamento foi possível observar a ocorrência de morte celular sem o envolvimento de caspases. Nas concentrações testadas, portanto, não foram observadas marcação significativa de células em apoptose inicial. Portanto, em conjunto com os dados de exposição de fosfatidilserina, pode-se sugerir que a fração FAIII6-8 induz morte celular diferente de apoptose

na linhagem NCI-460, pois não há exposição de fosfatidilserina (dada ausência de marcação exclusiva com anexina V), há a perda de integridade de membrana celular precocemente (as células são marcadas com 7-AAD) e a ausência de ativação de caspases.

Figura 4. Porcentagem de células NCI-H460 (pulmão) com caspases ativas marcadas e/ou 7-AAD com tratamento 24 horas com a fração FAIII6-8 de *Croton campestris* nas concentrações indicadas.



Valores representam média \pm SEM de $n=4$. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$, diferença estatística com relação ao DMSO (One way ANOVA seguido de teste Tukey).

Evolutivamente conservado, o processo apoptótico é fundamental na homeostase tecidual podendo ser iniciado por via intrínseca (mitocondrial) ou extrínseca (via receptores de membrana). Nesse tipo de morte, a membrana celular permanece intacta e pode ser silenciosamente reconhecida por células do sistema fagocitário e eliminada. No entanto, as células tumorais apresentam diversas estratégias para limitar ou mesmo escapar da apoptose. Alguns tumores apresentam perda de função do supressor tumoral P53, diminuição da expressão de fatores pró-apoptóticos (Bax, Bim), aumento da expressão de reguladores anti-apoptóticos como (Bcl-2, Bcl-xL) e de sinais de sobrevivência. Assim, a evasão dos processos de morte por apoptose é uma característica marcante das células malignas e fundamental para a progressão tumoral (Fulda, 2010; Hanahan & Weinberg, 2011).

Antigamente, acreditava-se que a morte celular era dada por eventos opostos e exclusivos e que o balanço “apoptose *versus* necrose” era o cerne de muitos trabalhos. Hoje em dia diversos tipos de morte celular já foram descritos e cada um tem muitas particularidades com vantagens e desvantagens de acordo com o contexto fisiológico. Um tipo de morte celular recentemente descrito é a necroptose. (Yuan & Kroemer, 2010; Wen et al., 2012; Linkermann & Green, 2014).

Necroptose é caracterizada pelo inchamento celular, eventual disfunção mitocondrial, permeabilização da membrana celular, depleção de ATP e liberação do conteúdo citoplasmático no espaço extracelular. Outra característica é a alta produção de ROS (espécies reativas de oxigênio – *reactive oxygen species*) e, ao contrário da apoptose, não envolve fragmentação de DNA característica de apoptose (Giampietri et al., 2014; Chen et al., 2016). Embora apresente características morfológicas similares à necrose, trata-se de um tipo de morte celular altamente regulado por uma plataforma de proteínas que apresenta pontos em comum com a apoptose. Enquanto a apoptose depende da ativação de caspases, a necroptose é negativamente regulada por elas e precisa da ação das quinases RIP1 e RIP3 (quinase que interage com receptor 1 e 3- *receptor-interacting kinase 1 e 3*), que são os mediadores chave desse processo (Galluzzi & Kroemer, 2008; Christofferson & Yuan, 2010; Vandenabeele et al., 2010). Inclusive já foi relatado a ativação do processo necroptótico como via de morte alternativa pós falha das caspases, ou seja, a regulação cruzada entre esses dois processos mostra que a necroptose pode agir como uma via de morte *backup* quando a cascata apoptótica está comprometida (Han et al., 2011; Goodall et al., 2016).

Os resultados observados para a fração FAIII6-8 indicam ausência de ativação de caspases durante o processo de morte celular da linhagem NCI-H460. Sabendo que a apoptose depende da ativação de caspases e, contrariamente, a necroptose é negativamente regulada por elas, os dados endossam esse evento como um dos possíveis mecanismos de morte de células HCI-H460 tratadas com a fração ativa FAIII6-8 obtida de *Croton campestris* (Vandenabeele et al., 2010; Negroni et al., 2015). Como já discutido, um mecanismo alternativo à apoptose (necroptose, por exemplo) pode ser um ponto chave na regressão tumoral e citotoxicidade, o que é compatível com os resultados obtidos. Além disso, a necroptose e apoptose ocorrem por vias que se inter-relacionam, apresentando o envolvimento, com ativação ou inibição, de TNF, TRADD, TRAF2 e RIP1. A ligação desses receptores e proteínas pode levar ao recrutamento de FADD e caspase-8, componentes clássicos da via extrínseca da apoptose. No entanto, quando presente, a RIP3 forma um outro tipo de complexo, o necrossomo, que junto com

MLKL, denota um complexo sinalizador proteico. Assim, a inibição de caspase 8 promove a atividade do necrossomo o que resulta em necroptose (Wang et al., 2014; Negroni et al., 2015).

O ácido gálico, componente majoritário da fração FAIII6-8, tem apenas um relato na literatura mostrando sua associação com a indução de necroptose. Nesse trabalho, Chang e colaboradores (2015) relatam a morte celular induzida pela auto-oxidação do ácido gálico em células hepáticas estreladas. Os dados desse estudo indicam que o ácido gálico produz estresse oxidativo através da supressão da atividade de catalase e via depleção do sistema GSH. Assim, o estresse gerado por ROS desencadilharia a produção de TNF- α , levando ao aumento de proteínas regulatórias chave da necroptose como TRADD e RIP3, além da inativação de caspase-8. Esses dados são coerentes com resultados de perda de integridade de membrana obtidos para o tratamento com a fração FAIII6-8 sobre células NCI-H460. Além disso, os resultados mostrados a seguir também apontam a participação de ROS e de RIP nas vias celulares estudadas.

4.3. A fração FAIII6-8 aumenta a produção de ânions superóxidos e peróxido de hidrogênio além de causar diminuição do potencial de membrana mitocondrial em células NCI-H460

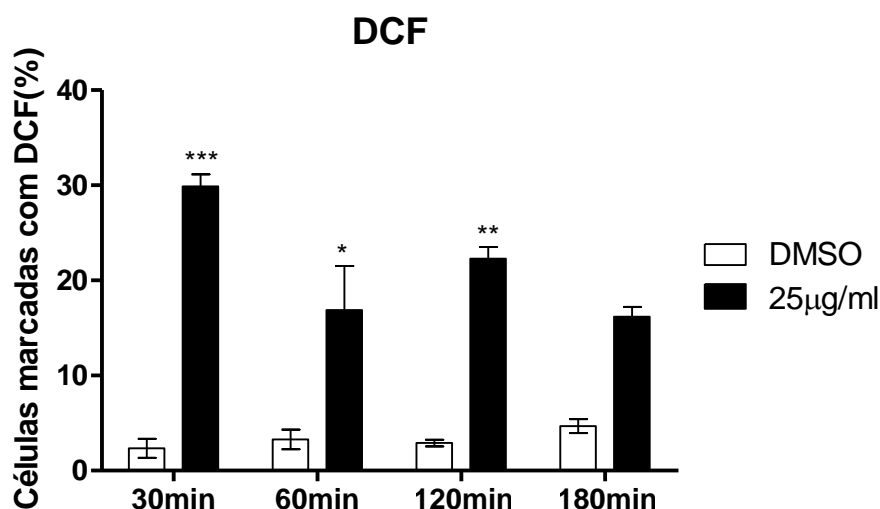
A fisiologia mitocondrial bem como sua dinâmica bioenergética são de fundamental importância para a vida da célula e sua alteração pode culminar em processos de morte celular (Parsons & Green, 2010). Dessa forma, a permeabilização de membrana mitocondrial, a perda do potencial de membrana e o aumento da produção de ROS representam eventos relacionados às alterações mitocondriais e celulares que podem auxiliar no estudo da ação de um determinado composto.

Um dos efeitos da quimioterapia sobre as células é a morte celular promovida, em parte, pela produção de ROS intracelular (Longato et al., 2015). Dessa forma, avaliou-se a produção desses radicais livres intracelulares pelo tratamento com a fração FAIII6-8 em células NCI-H460, nos tempos de 30, 60, 120 e 180 minutos. A marcação com DCFH-DA foi utilizada para detectar a geração de ROS intracelular. Essa substância se difunde rapidamente pela membrana plasmática celular e é desacetilada por esterases para a forma DCFH não fluorescente. Na presença de ROS citoplasmático, DCFH é rapidamente oxidada e forma o produto DCF, que é altamente fluorescente. Assim, a intensidade de DCF fluorescente é proporcional à quantidade de ROS intracelular.

O gráfico da figura 5 mostra significativo aumento da intensidade de fluorescência para a concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ em 30, 60 e 120 minutos. Esses dados sugerem que o aumento

do nível de ROS, portanto, pode estar envolvido na citotoxicidade induzida pelo tratamento com a fração FAIII6-8 em células NCI-H460. Como esse aumento não foi significativo no tempo de 180, sugere-se que nesse período a célula pode ter usado de mecanismos celulares para neutralizar esses radicais livres.

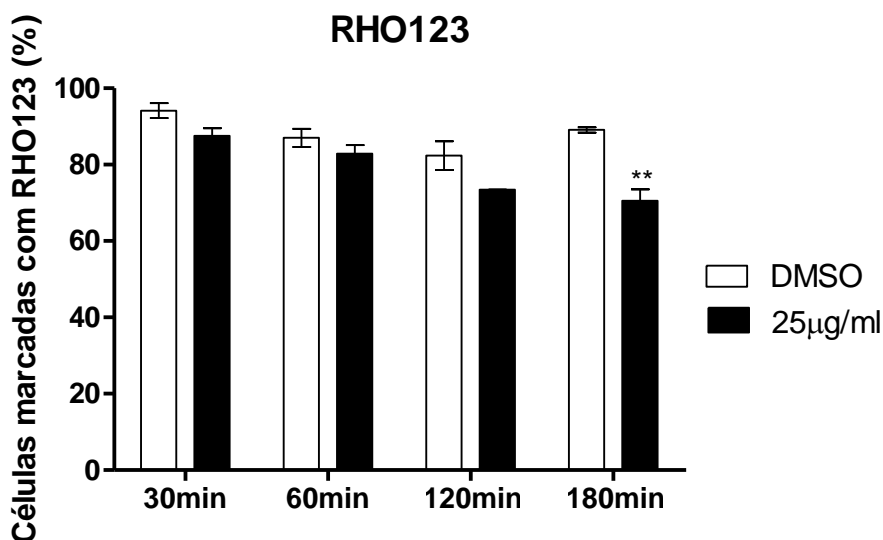
Figura 5. Porcentagem de células NCI-H460 marcadas com DCF-H tratadas em diferentes tempos com a fração FAIII6-8 obtida de *Croton campestris*.



Valores representam média \pm SEM de $n=3$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, diferença estatística com relação ao DMSO (One way ANOVA seguido de teste Tukey).

A fim de avaliar os efeitos da fração FAIII6-8 sobre o potencial de membrana mitocondrial, avaliou-se a porcentagem de células marcadas com a sonda rodamina 123, marcador de perda de potencial de membrana, após o tratamento de 30, 60, 120 e 180 minutos com 25 $\mu\text{g/mL}$ da fração FAIII6-8 (Fig. 6). Comparando com as células tratadas com veículo, não houve diferença estatística para os tempos de 30, 60 e 120 minutos. Já no tempo de 180 minutos, houve significativa perda do potencial de membrana mitocondrial com diminuição da intensidade de fluorescência para 29,5% das células tratadas com a fração FAIII6-8 contra 10,4% nas células controle, indicando que existe perda de potencial mitocondrial posteriormente a geração de ROS.

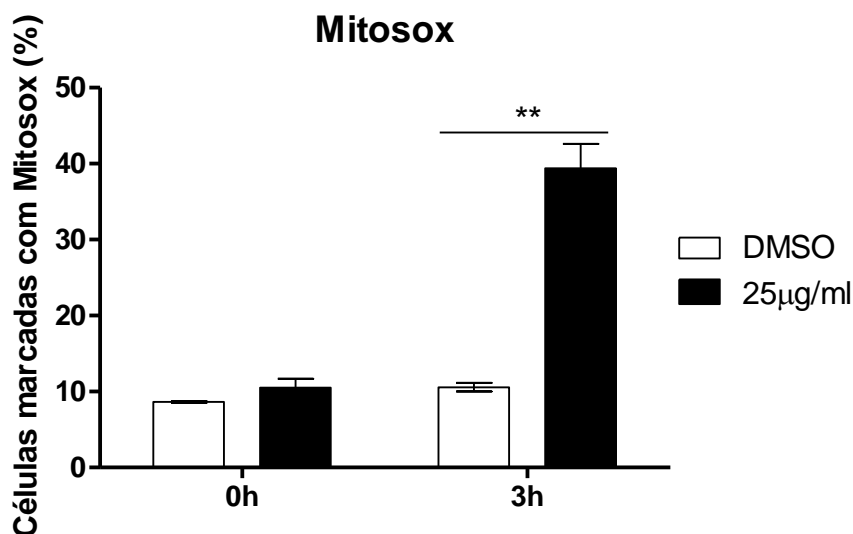
Figura 6. Porcentagem de células NCI-H460 marcadas com Rho123, tratadas em diferentes tempos com a fração FAIII6-8 obtida de *Croton campestris*.



Valores representam média \pm SEM de $n=3$. ** $p < 0,01$, diferença estatística com relação ao DMSO (One way ANOVA seguido de teste Tukey).

Com o objetivo de avaliar a produção de ânions superóxido decorrentes da perda de potencial mitocondrial, as células foram tratadas por 3 horas e, ao final desse tempo, foram marcadas com Mitosox Red e tiveram a intensidade de fluorescência avaliadas por citometria de fluxo. O tratamento com a fração FAIII6-8 levou ao aumento da concentração de superóxidos na célula, sendo este aumento de 2,7 vezes em comparação com as células tratadas com o controle DMSO (Fig. 7).

Figura 7. Porcentagem de células NCI-H460 marcadas com Mitosox-Red tratadas por 3 horas com a fração FAIII6-8 obtida de *Croton campestris*.



Valores representam média \pm SEM de $n=3$. ** $p < 0,01$, diferença estatística com relação ao DMSO (One way ANOVA seguido de teste Tukey).

Em sistemas de tecidos biológicos normais, as ROS são geradas continuamente como subprodutos de diversas reações celulares, porém são eliminadas na sequência. Por isso, o nível de ROS é dito basal em células normais. Esse equilíbrio desempenha papel essencial na regulação de diversas vias intracelulares. Assim, a abundante geração de ROS durante o estresse oxidativo pode afetar lipídios, proteínas e estruturas celulares, podendo determinar o destino da célula afetada (Subramanian et al., 2016). Assim, enquanto em células normais a indução de geração de ROS normalmente é revertida por sistemas antioxidantes, em células tumorais o nível basal de ROS já é tão grande que a indução de ROS adicional pode extrapolar os limites para a eliminação pelo sistema antioxidante e essas células morrem de maneira seletiva. Além disso, mecanismos antioxidantes estão em geral inibidos ou corrompidos em células tumorais (Diehn et al., 2009; Raj et al., 2011). Por isso, esse efeito sugere que aumentar mais ainda a concentração desses radicais leva a exaustão do mecanismo compensatório das células tumorais, levando-as a ativação de vias de morte celular e, conseqüentemente, limitando a progressão tumoral (Galadari et al., 2017).

Dessa forma, a morte celular induzida pela ação da fração FAIII6-8 sobre células NCI-H460 pode estar diretamente relacionada ao estresse oxidativo gerado pela produção de ROS. Aqui os dados mostram tanto a produção de superóxidos quanto o aumento na concentração de peróxido de hidrogênio. Relacionada a esses resultados, também pudemos

observar a perda do potencial de membrana mitocondrial. Assim, o dano mitocondrial pode levar à diversos prejuízos à fisiologia celular, inclusive a depleção da produção de ATP, fato relacionado à morte celular do tipo necrótica (Eguchi et al., 1997; Hensen et al., 2015). Embora diversas vias possam ser reguladas por ROS, quando o sistema antioxidante não atua de forma eficiente para conter o estresse oxidativo ocorre a formação de poros de transição mitocondrial, que auxilia na diminuição da produção de ROS pela diminuição do potencial de membrana. Se essa situação, entretanto, se prolongar, há o rompimento da homeostase do balanço redox, havendo dano celular e morte (Ronchi et al., 2011; Espinosa-Diez et al., 2015).

Mesmo sendo um tipo de morte não descrito completamente, sabe-se que a produção de ROS tem sido apontada como o fator executor de necroptose em alguns tipos celulares (Yuan & Kroemer, 2010). Assim, considerando os dados observados para o tratamento com a fração FAIII6-8, tais como a evidente marcação por 7-AAD, o não envolvimento de caspases, o aumento da produção de ROS observado junto à perda de potencial de membrana, temos dados que descrevem um cenário compatível com os eventos relacionados à morte celular por necroptose. No entanto, os tipos específicos de ROS envolvidas e como essas moléculas promovem a necroptose não está completamente determinado (Galadari et al., 2017).

Sabendo que a fração FAIII6-8 é rica em ácido gálico, é importante relacionar esse componente aos resultados obtidos. Dessa forma, apesar de ser amplamente utilizado em aditivos alimentares como sequestrador de ROS, o ácido gálico pode sofrer alterações moleculares que podem modificar suas propriedades farmacodinâmicas e, consequentemente suas propriedades biológicas (Van der Meeren, 1987). Dados obtidos por Kawada e colaboradores (2001) relataram que o ácido gálico foi capaz de induzir apoptose em linhagens de células LL-2 de câncer de pulmão humano. Além disso, no mesmo estudo, foi sugerido que a combinação do ácido gálico com outros fármacos antitumorais poderia ser efetiva em protocolos de tratamento do câncer de pulmão (Kawada et al., 2001). Estudos utilizando linhagem de células de câncer de próstata LNCap demonstraram que a ação antitumoral do ácido gálico está ligada à indução da apoptose relacionada à formação de ROS, as quais seriam produzidas a partir da auto oxidação dessa substância nessa linhagem celular (Russell et al., 2012). Corroborando esse resultado, um recente estudo demonstrou que o ácido gálico é capaz de induzir morte celular em células HeLa através do aumento da depleção do sistema antioxidante GSH (Park, 2017). Subramanian e colaboradores (2016) também correlacionaram a diminuição da proliferação celular com o aumento de ROS, que levaria à parada do ciclo celular, o que também é compatível com os resultados obtidos pelo tratamento com FAIII6-8.

Outros trabalhos relatam ainda a ativação da via de sinalização ATM kinase (responsável por fosforilar várias proteínas relacionadas a parada do ciclo celular) e a depleção da enzima antioxidante GSH (glutathiona reduzida), o que também corrobora com o aumento de ROS pela ação do ácido gálico (Verma et al., 2013; Lima, 2014).

Assim, a atividade antitumoral do ácido gálico relaciona-se à múltiplos alvos moleculares, a depender do tipo de linhagem estudada. Dessa maneira, demonstramos pela primeira vez a ação de fração rica em ácido gálico sobre linhagem de tumor de pulmão humano NCI-H460, obtendo resultados pioneiros com relação à sua atividade e relatando o envolvimento de ROS em sua ação antiproliferativa.

4.4. A fração FAIII6-8 leva ao aumento na expressão de proteínas relacionadas à necroptose

Com o objetivo de investigar os mecanismos de ação da fração FAIII6-8 sobre células NCI-H460, foram analisadas a expressão de proteínas envolvidas em vias intracelulares relacionadas a sobrevivência, proliferação celular e à morte necroptótica.

Os complexos de sinalização induzidas por TNF podem mediar a ativação de NF- κ B, apoptose e necroptose (Borghini et al., 2016). A estimulação de TNFR1 por TNF conduz à formação de um complexo intracelular na membrana citoplásmica (complexo I) que inclui a TRADD, TRAF2, RIP1 e cIAP1 (Dondelinger et al., 2016). Ubiquitinação de RIP1 por cIAP1 leva ao recrutamento de NEMO, uma subunidade reguladora do complexo IKK. Isso por sua vez ativa NF- κ B, que nesta situação ativará a transcrição de vias pró-sobrevivência (Holler et al., 2000; Zhang et al., 2000; Hur et al. 2003). Além disso, RIP1 também está envolvida na formação do complexo IIa, este complexo inclui FADD e caspase-8, que ativam uma cascata de caspase para mediar a apoptose. Sob condições de evasão de apoptose, como inativação de caspase-8, RIP1 pode interagir com RIP3 formando o complexo IIb ou necrossomo, que está envolvido na mediação da necroptose através da fosforilação de MLKL (Meylan & Tschopp, 2005; Melo-Lima et al., 2014).

A fim de verificar a presença de proteínas indicadoras de vias de morte celular não apoptótica, como a morte por “necrose programada” ou necroptose, investigou-se a expressão da *receptor-interaction protein* ou proteína interação com receptor (RIP). Essa quinase pertence à família serina-tirosina quinases (RIP, RIP2, RIP3 and RIP4), que são importantes reguladores do estresse celular.

Conforme podemos ver na figura 8, a expressão de RIP (RIPK1) nas células NCI-H460 já se encontra aumentada após 3 horas de tratamento com a fração FAIII6-8. Este aumento

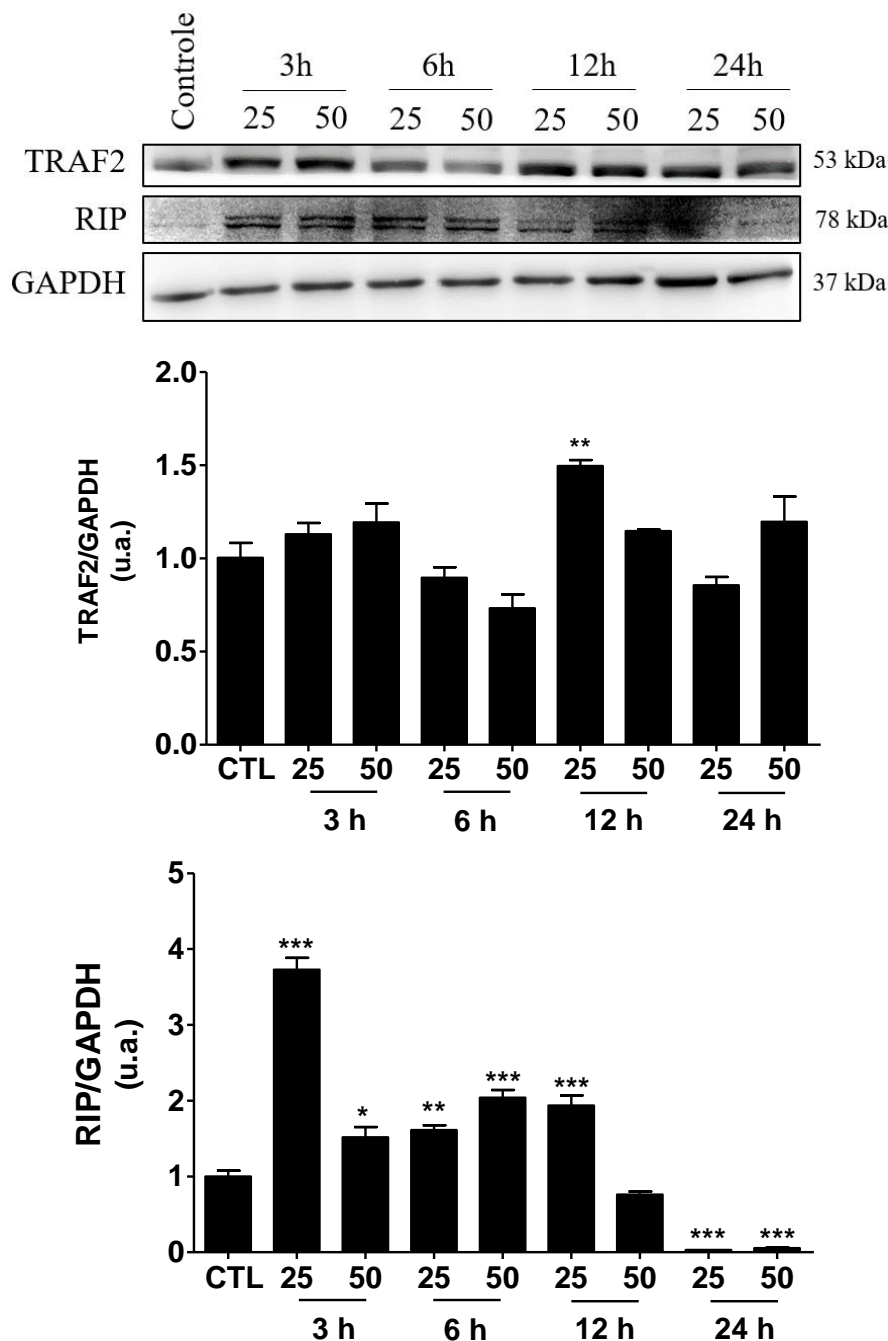
pode ser verificado até o tempo de 6 horas para a maior concentração e até 12 horas para as células tratadas com a concentração de 25 µg/mL. Tal dado é compatível com os dados de citometria, onde após três horas de tratamento com as frações ativas de *Croton campestris* observamos perda de integridade de membrana e marcação evidente por 7-AAD. Portanto esses dados sugerem o envolvimento de morte por necroptose nas primeiras horas de tratamento. No entanto, RIP parece ter uma menor participação no mecanismo de morte desencadeado pelo tratamento prolongado (24 horas) com a fração FAIII6-8. Isso pode ser explicado pela variedade funcional de RIP1 já que diferentes níveis de condições de estresse podem influenciar na expressão dessa quinase e, portanto, determinar as vias a serem ativadas (Meylan & Tschopp, 2005).

Dessa forma, conforme demonstrada na avaliação de ROS, pode ser que a grande produção desses radicais no início do tratamento gere um alto nível de estresse para a célula, o que aumenta a expressão de RIP1 gerando a morte por necroptose. Além disso, a geração de ROS promove a estabilização do complexo necrossômico RIP1/ RIP3 via retroalimentação positiva. Por outro lado, os eliminadores de radicais enfraquecem a montagem do necrossomo RIP1 / RIP3 e a fosforilação de MLKL (Schenk & Fulda, 2015). Assim, as células que sobrevivem no início do tratamento, período em que há expressiva geração de ROS e ativação de RIP, com necroptose programada, após 24 horas podem ter sido capazes de reestabelecer o controle de oxidação celular, não havendo mais um estímulo para o aumento na expressão de RIP, havendo, portanto, morte por necrose, ou não programada.

Além da participação de ROS na estabilização do complexo IIB que leva a necroptose, a literatura relata que TRAF2 pode interagir com MLKL e impedir sua interação com RIP1 e RIP3. Dessa forma, TRAF2 tem sinalização negativa na necroptose (Zhang et al., 2010; Borghi et al., 2016; Dondelinger et al., 2016). Para confirmar a ativação do complexo IIB, devido ao aumento de RIP1, anteriormente verificado, decidimos investigar a expressão de TRAF2.

Os dados obtidos para a expressão de TRAF2 também são coerentes com a ocorrência de morte por necroptose em células NCI-H460 tratadas com a fração FAIII6-8. Isso porque não há inicial ativação de TRAF2. Além disso, como não foi observada ativação de caspases em células NCI-H460 pelo tratamento com a fração ativa de *Croton campestris*, e há aumento da concentração de RIP1 nos tempos iniciais de tratamento, pode-se sugerir que RIP1 está livre para formar o necrossomo junto à RIP3 e MLKL e levar à célula à necroptose, não sofrendo influência de TRAF2 (Melo-Lima et al., 2014).

Figura 8. Razão da expressão das proteínas TRAF2 e RIP em relação a expressão da proteína constitutiva GAPDH em *western blotting*, em células NCI-H460 tratadas com 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ da fração FAIII6-8 por 3, 6, 12 e 24 horas.



Dados obtidos através de análise densitométrica de 3 experimentos independentes. Valores representam média \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, diferença estatística com relação ao controle (*One way ANOVA* seguido de teste Tukey).

Até o momento nossos dados sugerem que o mecanismo de morte desencadeado inicialmente nas células de câncer de pulmão é a necroptose. Como RIP1 pode estar envolvido na ativação da via NF- κ B, decidimos investigar a atividade de NF- κ B. Como TRAF2 não se

encontra ativada nos tempos iniciais, espera-se que NF- κ B também não esteja, confirmando a não formação do complexo I e sim a do complexo IIb.

O fator nuclear kappa B (NF- κ B) representa uma família de fatores de transcrição evolutivamente conservada que é um elemento chave na regulação de diversas vias relacionadas à imunidade inata e adaptativa, resposta imune, resposta ao estresse, inflamação, câncer, proliferação celular entre outras (Tornatore et al., 2012; Gilmore, 2014; Mitchell et al., 2016). O NF- κ B destaca-se pela sua vasta gama de ações com diversas proteínas interligadas na dinâmica de sua ativação. Sendo assim, o NF- κ B tem um papel essencial na oncogênese e desordens metabólicas. O sistema de sinalização NF- κ B, o qual compreende as interações entre os dímeros de NF- κ B, reguladores I κ B e complexos IKK, é responsivo à uma série de estímulos que, de acordo com o sinal recebido, desencadearão diferentes resultados celulares ativando vias regulatórias ativadoras e/ou inibidoras (Hayden & Ghosh, 2004; Mitchell et al., 2016). O NF- κ B, quando não estimulado, fica no citoplasma ligado ao I κ B, uma proteína inibitória, o que impede a translocação do NF- κ B para o núcleo. Para reverter esse quadro, é necessária a fosforilação de I κ B, que recebe adição de ubiquitina e na sequência é degradada pelo complexo proteossoma. A fosforilação do I κ B ocorre através da ação de proteínas quinase como o complexo I κ B quinase (IKK), formada por duas subunidades, IKKa e IKKb. Assim, o desligamento do complexo I κ B/NF- κ B libera o NF- κ B para ser transportado para o núcleo, onde se liga às sequências específicas da região promotora de genes-alvo, aumentando sua expressão (Zandi et al., 1997). Há uma ampla gama de genes que podem ser regulados por NF- κ B, como citocinas, quimiocinas, imunoreceptores, proteínas envolvidas na apresentação de antígenos, moléculas de adesão celular, genes de resposta ao estresse, receptores de superfície celular, reguladores de apoptose, fatores de proliferação, outros fatores de transcrição, entre vários outros (Hayden & Ghosh, 2012; Mitchell et al., 2016). A cada dia, mais e mais trabalhos vêm apontando novos genes e vias celulares relacionadas a esse promíscuo fator de transcrição.

Os resultados demonstram que as células tratadas com a fração ativa FAIII6-8 de *Croton campestris* nas concentrações de 25 e 50 μ g/mL por diferentes tempos não apresentaram aumento significativo na atividade de NF- κ B, como indicado na comparação entre a fosforilação do sítio ativatório (Ser536) e a NF- κ B não fosforilada (Fig. 9). É possível inclusive verificar a diminuição da ativação de NF- κ B em 12 e em 24 horas. Sendo um fator pró sobrevivência e que atua em processos de proliferação celular, a inibição de NF- κ B é mais um dado que reforça a atividade citotóxica da fração FAIII6-8.

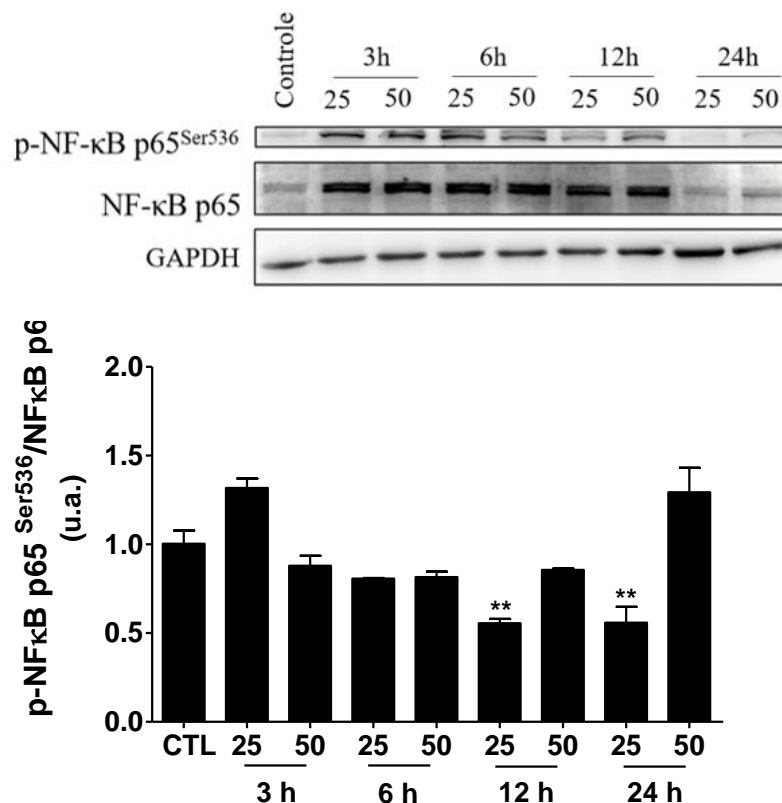
Um dos mecanismos que leva células tumorais à resistência à apoptose é a superexpressão de proteínas pró-sobrevivência como as proteínas inibidoras de apoptose

(IAPs). Assim, a ativação aberrante de IAPs pode afetar processos apoptóticos por inibição de caspases e provendo a sinalização por NF- κ B (Chen et al., 2016). Em alguns casos apoptose e necrose podem ser ativadas pelos mesmo receptores de membrana como o TNFR1. A ausência de RIP1 permite que haja morte celular dependente de caspase-8 em resposta ao TNF, em um processo que envolve ativação de TRAF2 (Berghe et al., 2015). Essa sinalização paradigmática mostra a indução de diferentes respostas dependendo do contexto de sua ativação. Enquanto TNF pode levar a ativação de NF- κ B e consequente expressão de fatores de sobrevivência, em condições onde a via TNF está bloqueada, pode haver indução de apoptose ou necroptose. Assim, quando a ativação de NF- κ B dirigida por TNF e apoptose estão anuladas, as células ficam pré-dispostas à morte celular necroptótica (Berghe et al., 2015; Tortola et al., 2016).

Thapa e colaboradores (2011) demonstraram que NF- κ B previne a necroptose mediada por IFN γ através da neutralização de ROS para a preservação da integridade mitocondrial. Portanto, a necroptose na ausência de NF- κ B procede via progressivo acúmulo de ROS mitocondrial, dados que embasam os resultados obtidos do tratamento de células NCI-H460 com a fração FAIII6-8.

Este resultado, em conjunto com os resultados anteriores, confirmam o papel da necroptose como mecanismo de morte. É interessante observar que o efeito molecular de FAIII6-8 não foi concentração dependente para nenhum dos marcadores investigados, o que reflete o potencial da fração em modular as vias mesmo em concentrações menores.

Figura 9. Razão da expressão do fator de transcrição NF- κ B, e suas respectivas formas fosforiladas ativas, em western blotting, em células NCI-H460 tratadas com a fração FAIII6-8 25 e 50 μ g/mL por 3, 6, 12 e 24 horas.



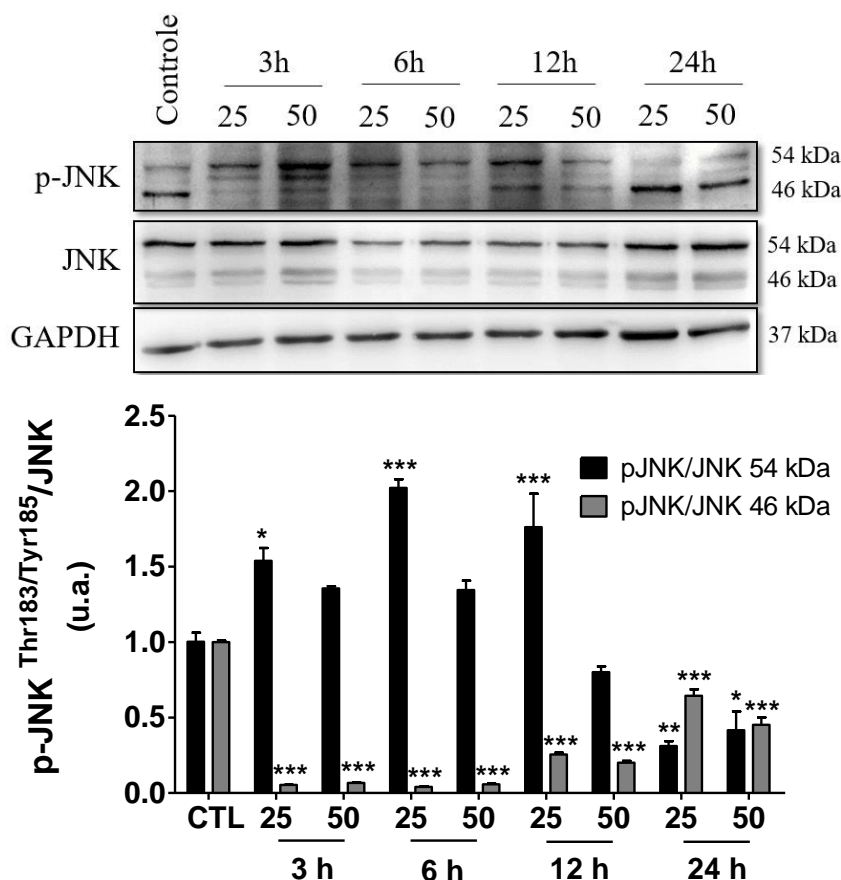
Dados obtidos através de análise densitométrica de 3 experimentos independentes. Valores representam média \pm SEM. ** $p < 0,01$, diferença estatística com relação ao controle (*One way ANOVA* seguido de teste Tukey).

Outro marcador importante na relação entre vias de morte e stress celular é o JNK. Quando uma informação é recebida por receptores de membrana celular ela é transmitida via complexa rede de vias de sinalização. Uma dessas vias é a cascata da JNK (quinase c-Jun N-terminal), uma proteína membro da família MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) que regula uma série de processos biológicos como alguns envolvidos na tumorigênese (Davis, 2000; Davies & Tournier, 2012). Essa via é ativada frente à citocinas pró-inflamatórias ou estresses intra e extracelular, e sua regulação interfere diretamente na proliferação celular, sobrevivência e diferenciação. Estudos mostram que diferentes intensidades e duração de sinais ativadores de JNK podem gerar respostas contrárias. Assim, ativação transiente de JNK causa sobrevivência celular, já a ativação prolongada induz apoptose (Ventura et al., 2006). Além disso, a JNK tem papel crítico tanto na morte celular induzida via receptor de superfície quanto nas vias apoptótica desencatilhada intrinsecamente (mitocondrial) (Dhanasekaran & Reddy,

2008). A proteína JNK possui alguns subtipos e a JNK3 apresenta *splicing* alternativo em sua formação e, portanto, pode apresentar a região carboxi-terminal mais longa (54kDa) ou mais curta (46kDa) (Coffey, 2014).

Assim, a expressão de JNK e p-JNK em células NCI-H460 tratadas com 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ da fração FAIII6-8 foi avaliada. De acordo com a figura 10, a atividade de p-JNK (54kDa) em células tratadas com 25 $\mu\text{g/mL}$ aumenta em 3, 6 e 12 horas, como é possível observar comparando a fosforilação nos resíduos de ativação (Thr183/Tyr185) com a proteína total. Por outro lado, no tratamento mais longo a atividade diminui significativamente em relação ao controle. Já nas células tratadas com 50 $\mu\text{g/mL}$ só há diferença estatística em 24 horas, com a diminuição na atividade da proteína. Já para a p-JNK de 46kDa, em todos os tempos e concentrações, houve significativa diminuição de sua atividade.

Figura 10. Razão da expressão de proteína JNK e sua forma ativa fosforilada (pJNK) em western blotting, em células NCI-H460 tratadas com 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ da fração FAIII6-8 por 3, 6, 12 e 24 horas.

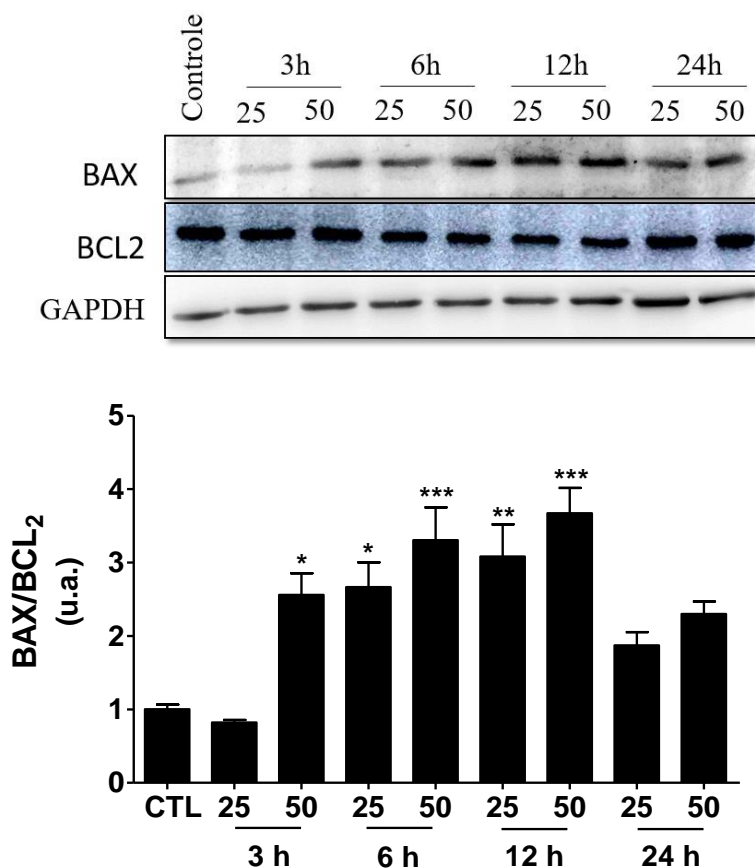


Dados obtidos através de análise densitométrica de 3 experimentos independentes. Valores representam média \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, diferença estatística com relação ao controle (*One way ANOVA* seguido de teste Tukey).

Além disso, JNK pode ter ações opostas sobre os dois mecanismos de morte celular apoptose e necroptose. Ventura e colaboradores (2004) demonstraram a participação de JNK na inibição da apoptose ao mesmo tempo que há potenciação de necroptose em fibroblastos estimulados com TNF. Os pesquisadores indicaram que JNK pode potencializar necroptose através do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) estimulada por TNF. De modo interessante, quando a sinalização de NF- κ B foi reduzida, TNF leva a um aumento de espécies reativas de oxigênio. ROS atuam de forma positiva ativando JNK, que conduz então a mais produção de ROS, e, finalmente, a morte celular por necroptose. Dessa forma, em conjunto nossos dados revelam aumento de ROS, o que leva à ativação de JNK, com inibição de NF- κ B e aumento de RIP, que em conjunto contribuem para o processo de necroptose.

É importante investigar a relação da expressão da proteína pró-apoptótica Bax e anti-apoptótica Bcl-2 (Croce & Reed, 2016). Comparando o grupo controle com as células tratadas não houve diferença entre a concentração de proteína Bcl-2. Já na concentração de Bax não se vê aumento significativo em sua expressão para o tempo de 3 horas nas células NCI-H460 tratadas com 25 μ g/mL (Fig. 11). Nessa mesma concentração e nesse mesmo tempo, as células apresentaram aumento na concentração de RIP1, um indicativo de morte necroptótica. No entanto, essa proteína mostrou-se superexpressa para os tempos de 6 e 24 horas, sugerindo que o aumento da razão Bax/Bcl-2 ocorre após o aumento de RIP e que deve sustentar a despolarização da membrana mitocondrial (Irrinki et al., 2011; Karch et al., 2015). Irrinki e colaboradores observaram que em fibroblastos embrionários murinos a indução de necroptose ocorre com ativação do complexo FADD-RIP1-RIP3-IKK γ , o qual induz despolarização da membrana mitocondrial via ativação do complexo Bax/Bak (Irrinki et al., 2011). Karch e colaboradores relatam que a ausência de Bax/Bak em fibroblastos de embrião murino duplo knockout para essas proteínas (*mouse embryonic fibroblasts* – MEFs) são resistentes a indução de necroptose, devido a problemas na formação de poros de transição de permeabilidade mitocondrial (Karch et al., 2015). Apesar de existirem tais relatos conectando necroptose e ativação de Bax, essa relação ainda é contraditória na literatura. Portanto outros estudos deverão ser feitos para complementar nossas observações.

Figura 11. Razão da expressão das proteínas BAX e BCL₂ em western blotting, em células NCI-H460 tratadas com a fração FAIII6-8 25 e 50µg/mL por 3, 6, 12 e 24 horas.

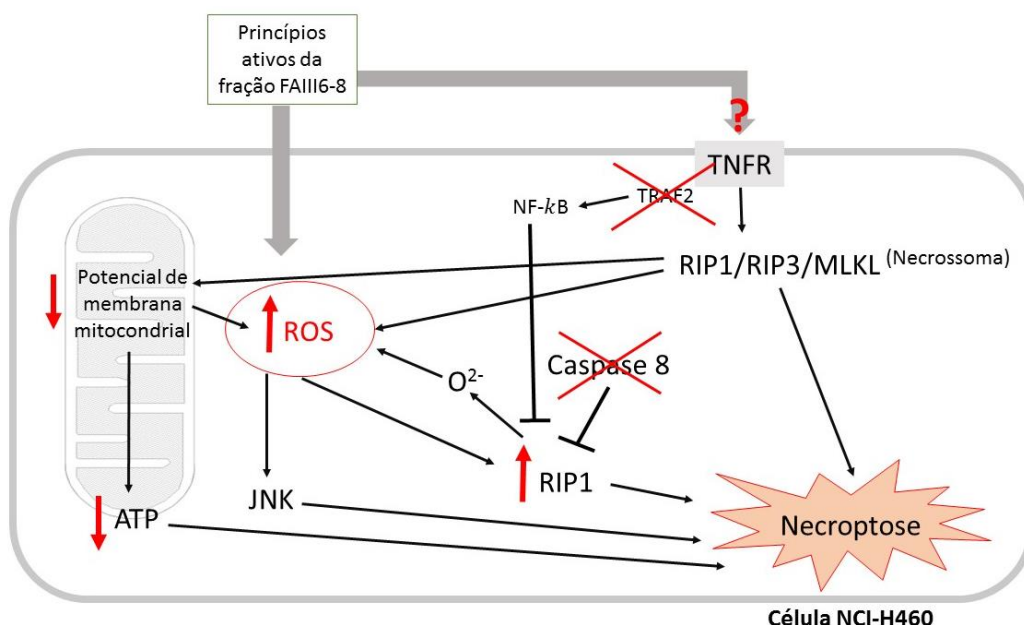


Dados obtidos através de análise densitométrica de 3 experimentos independentes. Valores representam média \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, diferença estatística com relação ao controle (*One way ANOVA* seguido de teste Tukey).

Tendo em vista todos os resultados obtidos pelo tratamento da linhagem NCI-H460 com a fração FAIII6-8, pode-se sugerir a seguinte ordem de eventos: o tratamento leva ao rápido aumento de ROS, concomitantemente com a perda de integridade de membrana evidenciada pela marcação por 7-AAD. Isso leva à produção de RIP1 que, somada ao não envolvimento de ativação de caspases, leva a célula à morte celular necroptótica. O aumento de ROS intracelular leva também ao aumento da forma ativa de JNK, que também atua nas vias necroptóticas. Além disso, a perda de potencial de membrana mitocondrial, com a depleção energética, é outro fator que dirige a célula para a morte celular e que também pode ocorrer em consequência da produção de ROS e da ativação de RIP, gerando produção de espécies reativas adicionais como os ânions superóxidos, que atuam como *feedback* positivo (Fig. 12). Após 12 horas, a produção de ROS deixa de sustentar a ativação de RIP1, cuja expressão diminui. No entanto, com 24 horas de tratamento, a fração mantém sua atividade antiproliferativa, visto a parada do ciclo em

G1 e inibição de NF- κ B, diretamente ligado às vias de proliferação que estão inibidas. A diminuição de TRAF sugere inibição da formação do complexo I pós ativação de receptores TNF, podendo haver ativação alternativa do complexo IIb ou necrossomo, composto por RIP1/RIP3/MLKL, o que sugere que o tratamento ativa receptores TNF. A não formação do complexo I justifica a ausência de atividade de NF- κ B e a não ocorrência de apoptose.

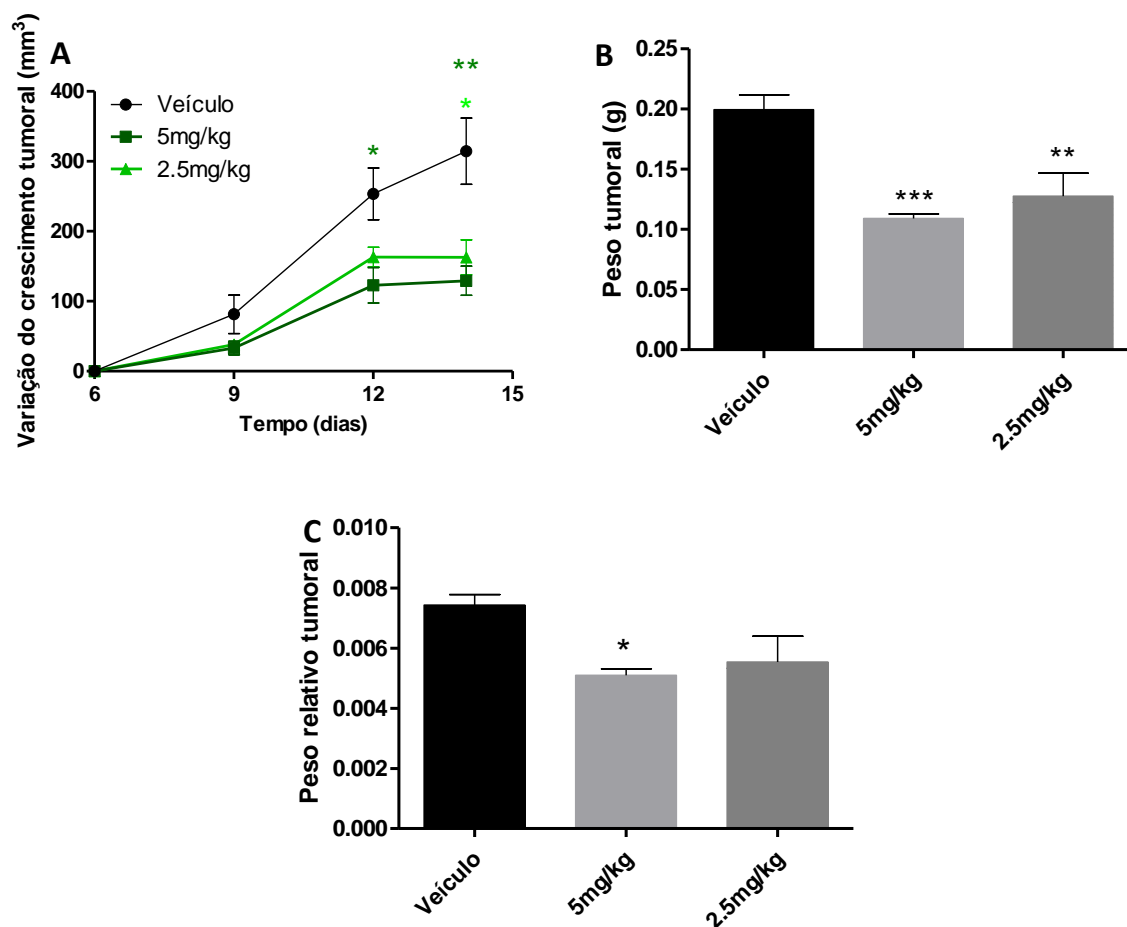
Figura 12. Vias envolvidas na ação antiproliferativa inicial da fração FAIII6-8 em células NCI-H460.



4.5. A fração FAIII6-8 inibe o desenvolvimento das células de tumor de pulmão murino em modelo de tumor sólido *in vivo*

Devido ao histórico de seletividade das frações ativas obtidas de *Croton campestris* pela linhagem de tumor de pulmão NCI-H460 (Monteiro, 2012), julgou-se importante a avaliação de sua atividade *in vivo* utilizando uma linhagem de tumor de pulmão murino, a fim de que fosse possível avaliar a atividade antitumoral sistêmica da fração ativa FAIII6-8. Para estudo foi selecionada a linhagem de carcinoma pulmonar de Lewis (LLC) oriunda de tumor espontâneo de camundongos C57BL6 e descoberta pela Dra. Margaret R. Lewis no *Wistar Institute* (Philadelphia, PA, EUA) em 1951 e estabelecida em 1980 (Bertran & Janik, 1980). Trata-se de uma linhagem bem estabelecida como modelo tumoral transplantável (Yan et al., 2012).

Figura 13. Avaliação do crescimento do tumor sólido de células LLC inoculadas no flanco de camundongos C56BL6.



A) Gráfico da variação do crescimento tumoral (volume) ao longo de 14 dias. **B)** Gráfico comparativo dos valores do peso tumoral final. **C)** Gráfico do peso relativo tumoral. Valores representam média \pm SEM (n=8). *p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001, diferença estatística com relação ao controle (*One way ANOVA* seguido de teste Tukey).

Já no nono dia de experimento a tendência de inibição do desenvolvimento tumoral já era evidente (Fig. 13). Tal efeito se tornou evidente a partir do décimo segundo dia, quando o tratamento com 5 mg/kg se mostrou efetivo na redução do desenvolvimento tumoral (51,6%). No último dia (14º Dia), o volume tumoral foi significativamente menor para as duas doses utilizadas. Comparando o peso absoluto tumoral, o grupo controle atingiu em média 200mg, enquanto os grupos tratados com 2,5 e 5 mg/kg, atingiram apenas 128 e 109 g, com 36% e 45% de redução respectivamente. Portanto, confirmando os resultados de atividade *in vitro*, o tratamento utilizando a fração FAIII6-8 foi capaz de inibir significativamente o desenvolvimento tumoral *in vivo*, reafirmando a potente ação *in vivo* da fração ativa de *Croton*

campestris. Dessa maneira, os componentes ativos da fração foram capazes de agir de maneira sistêmica, afetando o microambiente tumoral e a proliferação celular.

Os estudos aplicando o ácido gálico em experimentos *in vivo*, principalmente investigações relacionadas ao seu efeito antitumoral, são escassos. No entanto, na literatura é possível encontrar trabalhos estudando a atividade de frações ou extratos vegetais que apresentam ácido gálico como constituinte, como o extrato obtido das folhas de *Toona sinensis*, que mostra atividade antitumoral em modelo xenográfico de tumor sólido utilizando a linhagem HL-60 (leucemia) (Huang et al., 2012). Tseng e colaboradores (2012) também mostraram dados que indicam inibição crescimento e metástase de LLC em camundongos tratados com extrato de *Phyllanthus urinaria* contendo ácido gálico. A solução aquosa da planta *Saxifraga stolonifera*, que contém ácido gálico, apresentou efeito antitumoral em camundongos portadores de carcinoma pulmonar de Lewis (Liu et al., 2016).

Dessa forma, os resultados mostrando o efeito antitumoral da fração FAIII6-8 rica em ácido gálico em modelo de tumor sólido são inéditos e podem contribuir futuramente para elucidação da atividade desse componente que, baseado nos resultados até aqui descritos, mostra-se como potencial agente antitumoral.

5. Conclusão

Os resultados mostraram que o tratamento utilizando a fração FAIII6-8 ativas de *Croton campestris* leva à parada do ciclo celular em G1 e induz perda de seletividade de membrana e morte celular sem externalização de fosfatidilserina e independente de caspases. O aumento das espécies reativas de oxigênio parece ser o fator mais importante para o desencadeamento dos processos de morte celular. Além disso, também houve perda do potencial de membrana mitocondrial com aumento na produção de ânions superóxido. Parece haver ativação de receptor TNF, porém como TRAF2 está inativa, não há formação do complexo I e, portanto, ativação de NF- κ B. Ao invés disso, há ativação de RIP1, que somada à ausência de ativação de caspases, caracteriza morte por necroptose. O aumento da geração de ROS com a ativação de JNK pode contribuir também para essa resposta. A efetividade da atividade *in vitro* foi confirmada *in vivo* com a redução do desenvolvimento do tumor sólido utilizando linhagem de tumor de pulmão murino. Portanto, o conjunto de dados obtidos apontam para a ocorrência de necroptose como tipo de morte induzida pelo tratamento com a fração FAIII6-8 de *Croton campestris* A.St.-Hil.

CAPÍTULO 3

*Avaliação da atividade da fração FAIII6-8 obtida de Croton campestris A.St.-Hil
sobre colite e modelos de carcinogênese de cólon*

CAPÍTULO 3

Resumo

Mais de 50% dos quimioterápicos utilizados são oriundos de fontes naturais, incluindo os derivados sintéticos. Popularmente conhecida como velame-do-campo, *Croton campestris* A.St.-Hil. é um arbusto nativo brasileiro encontrado principalmente na região Nordeste. Estudos prévios já haviam mostrado potente atividade antitumoral *in vivo* de frações ativas de *C. campestris*, como a fração CFqb14 que foi capaz de inibir em 22,5% o crescimento tumoral em modelo de tumor sólido de Ehrlich com tratamento intraperitoneal de 4 mg/kg a cada 3 dias. Essa fração também apresentou potente atividade anti-inflamatória em modelos de inflamação aguda (edema de pata e peritonite induzidos por carragenina). Assim, os dados sugerem que a atividade antitumoral e anti-inflamatória dos componentes ativos de *Croton campestris* podem estar conectadas. O objetivo dessa etapa do trabalho foi o estudo das citocinas e outras moléculas envolvidas nas atividades antiproliferativa e anti-inflamatória da fração FAIII6-8. Para tal, o projeto foi desenvolvido no *Fox Chase Cancer Center*, Philadelphia, EUA, sob supervisão do Dr. Sergei Grivennikov com usufruto da bolsa de estágio e pesquisa no exterior (FAPESP 2015/18328-8). Os estudos focaram no microambiente inflamatório e utilizaram modelos murinos de colite aguda, câncer colorretal associado à colite e câncer colorretal esporádico. Os tecidos acometidos por tumores foram avaliados usando-se técnicas de biologia molecular como PCR em tempo real (RT-qPCR), ELISA e imuno-histoquímica. Assim, os animais submetidos à colite aguda induzida por dextran sulfato de sódio (DSS) e tratados com a fração FAIII6-8 apresentaram redução da injúria tecidual, bem como diminuição na expressão de mediadores pró-inflamatórios. Da mesma maneira, no experimento de carcinogênese induzida por azoximetano (AOM) e DSS, onde a inflamação promove o desenvolvimento tumoral, os animais tratados com a fração ativa de *C. campestris* apresentaram menor número e tamanho tumoral também com a redução de moléculas envolvidas no ambiente inflamatório. Já no modelo de carcinogênese esporádica, onde a inflamação surge após o estabelecimento de tumores, não houve diminuição significativa do número de tumores, mas o tamanho médio desses mostrou-se menor, sugerindo que a ação antitumoral da fração FAIII6-8 pode estar relacionada à prevenção do desenvolvimento da carcinogênese através de modulação da inflamação na fase de promoção tumoral. Corroborando os dados *in vivo*, macrófagos estimulados por LPS e tratados com a fração FAIII6-8 apresentaram completa inibição da expressão de interleucina-6 (IL-6). Portanto, os resultados inéditos puderam contribuir com dados sobre os possíveis mecanismos de ação das frações ativas obtidas de *Croton campestris*, além de auxiliar na compreensão da conexão da ação antitumoral e anti-inflamatória, evidenciando os componentes ativos da espécie como potenciais agentes preventivos do câncer.

1. Introdução

De acordo com o relatório GLOBOCAN de 2012, houve 14,1 milhões de novos casos de câncer no mundo, 8,2 milhões de mortes devido essa doença e 32,6 milhões de pessoas vivendo com a doença (dentro dos 5 anos de diagnóstico) (IARC, 2017). O mesmo relatório estimou que haveria cerca de 15,0 milhões de novos casos de câncer em 2015 e 23,9 milhões em 2035. Os tipos de câncer com maior incidência são os tumores de pulmão (13%), mama (11,9%) e colorretal (9,7%), com 19,4%, 6,4% e 8,5% de mortalidade respectivamente. No Brasil, a estimativa para o biênio 2016-2017 aponta que o câncer de intestino chegará a 7,8% dos novos casos de câncer nos homens e 8,6% nas mulheres (INCA, 2017).

O tratamento do câncer pode ser local com cirurgia ou radioterapia dependendo do tipo de tumor e do estágio de desenvolvimento. Entretanto, tumores que podem se espalhar sistemicamente requerem diferentes tipos de terapias usando uma combinação de variadas quimioterapias (Grahame-Smith & Aronson, 2004). Produtos naturais são uma importante fonte de novos componentes ativos. Mais de 50% dos quimioterápicos usados são obtidos de fontes naturais, incluindo derivados sintéticos (Newman & Cragg, 2012; Ciesla & Moaddel, 2016; Safe & Kasiapan, 2016). De 1981 a 2002, 48 das 65 novas drogas registradas para a terapia do câncer foram obtidas de produtos naturais (Safarzadeh et al., 2014). Nesse cenário, o Brasil tem a maior biodiversidade de plantas do mundo, que em sua maior parte, tem pouquíssimo ou nenhum estudo químico ou biológico (Brandão et al., 2008).

O gênero *Croton* é um dos mais diversos no mundo, com muitas propriedades medicinais já descritas (Salatino et al., 2007). Nesse sentido, a espécie *Croton campestris* A.St.-Hil. possui relatos populares de seu uso como anti-helmíntico, antitumoral, anti-inflamatório, antimicrobiano entre outros (Prata et al., 1993; Babili et al., 1998; Santos et al., 2005; Babili et al., 2006; Matias et al., 2010). Assim, baseado no histórico de atividades farmacológicas da espécie (Monteiro, 2012), nos resultados prévios apresentados no capítulo 1 e no fato de não haver nenhum estudo explorando a atividade dessa espécie em modelos *in vivo* relacionando câncer e inflamação, esse trabalho buscou a elucidação das vias celulares envolvidas e a sugestão do possível mecanismo de ação dos componentes antitumorais de *Croton campestris* A.St.-Hil.

Os resultados obtidos anteriormente sugeriram que as atividades anti-inflamatória e antitumoral das frações ativas podem estar conectadas. De fato, inflamação e câncer, estão relacionados: cerca de 20% dos cânceres são precedidos de inflamação crônica e/ou autoimunidade, como no caso de carcinoma hepatocelular (HCC) e hepatite, câncer de cólon câncer associado à colite (CAC) e doença inflamatória intestinal (IBD) e câncer gástrico e

gastrite induzida por *Helicobacter pylori* (Francescone et al, 2014). O processo inflamatório crônico é um fator agravante para o surgimento de neoplasias, considerando que representa potencial risco de mutações e proliferações celulares, podendo desencadear um processo cancerígeno.

Entretanto, o papel da inflamação não é limitado apenas à iniciação e crescimento tumoral. Sendo assim, o próprio tumor pode recrutar células imunes inflamatórias e superexpressar mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, um fenômeno chamado de “*Tumor elicited inflammation*”, ou seja, inflamação provocada por tumor (Grivennikov et al., 2010; Grivennikov et al., 2012; Grivennikov, 2013). Essa situação pode ocorrer dependendo do estágio de crescimento tumoral ou como resposta à terapia anticâncer e morte celular gerada (Wang & Karin, 2015).

A inflamação é um dos mais importantes estímulos do microambiente tumoral durante a carcinogênese, sendo categorizada como um *hallmark* do câncer (Hanahan & Weinberg, 2011; Vendramini-Costa et al., 2017). Enquanto os eventos genéticos celulares intrínsecos das células cancerígenas são essenciais para o desenvolvimento tumoral, o entendimento do ambiente tumoral também tem contribuído significativamente para o entendimento dessa patologia. Estudos mostram o papel de diferentes células imunes, citocinas e outros mediadores imunes em todos os passos da colonização tumoral, incluindo a iniciação, promoção e progressão tumoral, bem como nos processos metastáticos (Joyce & Pollard, 2009; Grivennikov, 2013). Apesar de sua importância patológica, os mecanismos da inflamação que promovem o câncer ainda não estão completamente elucidados. Portanto, ainda há a necessidade de novas terapias que foquem no microambiente tumoral, e então, a inflamação emerge como uma importante fonte de novos alvos para essas novas abordagens terapêuticas.

Um dos cânceres com maior influência do ambiente inflamatório é o câncer colorretal, que é o terceiro mais comum tipo de câncer em homens e mulheres e a terceira maior causa de morte por câncer nos EUA (Siegel et al., 2015). No CCR, 1% dos casos estão relacionados com desordens hereditárias, cerca de 3% são relacionados à síndrome de Lynch e 95% são esporádicos, não estando relacionados à predisposição genética (Irrazabal et al., 2014).

Doenças inflamatórias intestinais (IBD), tais como Doença de Crohn e Colite Ulcerativa, são fatores de risco para um tipo de CCR conhecido como CCR associado à colite (CAC) (Francescone et al., 2015). Indivíduos portadores da Colite Ulcerativa estão predispostos ao desenvolvimento de CCR, sendo a incidência de até 20% após 30 anos de desenvolvimento da doença (Kim & Chang, 2014). Por isso, terapias focando na redução da inflamação colônica são estratégias preventivas no contexto do câncer de cólon. De fato,

estudos clínicos mostram que anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), tais como a aspirina, apresentam efeito protetor contra os cânceres de cólon, mama, próstata e pulmão (Sandler et al., 2003). Desta forma, o ambiente inflamatório representa um importante alvo no tratamento e prevenção do câncer de cólon (Vendramini-Costa et al., 2017).

No capítulo 1 o estudo de caracterização de frações ativas obtidas de *Croton campestris* A.St.-Hil. relatou a presença de ácido gálico como composto majoritário da fração FAIII6-8. Além disso, como já apresentado anteriormente, a fração FAIII6-8 e outras frações semelhantes apresentaram atividade antiproliferativa *in vitro* e atividade antitumoral e anti-inflamatória *in vivo*. Baseado nesses resultados prévios, um modelo que associa inflamação e câncer foi escolhido com o objetivo de investigar a relação desses dois eventos além de avaliar a ação preventiva e terapêutica da fração FAIII6-8. Dessa forma, esse estudo teve por objetivo avaliar o potencial preventivo e terapêutico da fração FAIII6-8 obtida de *Croton campestris* em modelos de colite, CCR associado à colite e CCR esporádico, investigando também as citocinas, quimiocinas e moléculas envolvidas nessas atividades. Pela primeira vez relata-se a atividade quimiopreventiva e terapêutica de uma fração de *Croton campestris* em modelo *in vivo* de carcinogênese, conectando as ações antiproliferativa e anti-inflamatória.

2. Objetivo

O principal objetivo desse estudo foi a investigação da correlação entre os mecanismos de ação envolvidos na atividade antiproliferativa e anti-inflamatória da fração FAIII6-8 obtida de *Croton campestris* A.St.-Hil. no contexto da colite e câncer de cólon.

2.1. Objetivos específicos

- Avaliar os potenciais preventivo da fração FIII6-8 de *Croton campestris* em modelo de colite induzida quimicamente por DSS.
- Avaliar o potencial preventivo e terapêutico da fração FIII6-8 de *Croton campestris* em câncer colorretal associado à colite, bem como em modelo de câncer colorretal esporádico.
- Investigar os mecanismos de ação da fração ativa relacionados às respostas inflamatórias envolvidas nos modelos estudados, relacionando as ações antiproliferativa e anti-inflamatória.

3. Material e métodos

Esse estudo foi realizado sob supervisão do Dr. Sergei Grivennikov do Departamento de Controle e Prevenção do Câncer no *Fox Chase Cancer Center* (Philadelphia-PA, EUA). Os experimentos foram realizados em C56BL6 machos (8 semanas de idade) obtidos e mantidos no biotério da instituição sob condições controladas ($22 \pm 3^\circ\text{C}$ em ciclos de 12 horas claro/escuro com livre acesso à ração e água). Os protocolos de manutenção, pesquisa e eutanásia dos animais estão de acordo com os princípios e métodos adotados pelo *National Institutes of Health* (NIH) e foram aprovados pelo comitê de ética em pesquisa com animais do *Fox Chase Cancer Center*.

3.1. Perfil de citocinas produzidas por macrófagos extraídos do peritônio e estimulados por LPS

A fim de induzir peritonite, camundongos C57BL6 foram injetados intraperitonealmente com 2 mL de tioglicolato. Após 3 dias, os animais foram eutanasiados e injetados intraperitonealmente com 10 mL de meio *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) completo, ou seja, suplementado com 10% de SFB, 1% penicilina/estreptomicina e 0.1% de aminoácidos essenciais (Fig. 1). Após a lavagem da cavidade peritoneal, o líquido foi coletado, centrifugado e as células ressuspensas em novo meio sem SFB (Soro Fetal Bovino). As células foram incubadas por 4 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 e ambiente úmido.

Figura 1. Lavagem peritoneal em camundongo injetado com tioglicolato para extração de macrófagos.



Após 4 horas, o sobrenadante foi descartado e os macrófagos foram tratados com $25 \mu\text{g/mL}$ da fração ativa utilizando como veículo 1% de DMSO (dimetilsulfóxido) em meio de cultura para as células tratadas e controle. Em seguida, foram adicionados 100 ng/mL de

LPS em cada poço e, após 24 horas, o sobrenadante foi recolhido e procedeu-se com a dosagem da concentração proteica. O experimento foi realizado em triplicata (Vendramini-Costa et al., 2015).

3.2. Experimentos *in vivo*

3.2.1. Avaliação da atividade da fração FAIII6-8 sobre colite aguda induzida por DSS

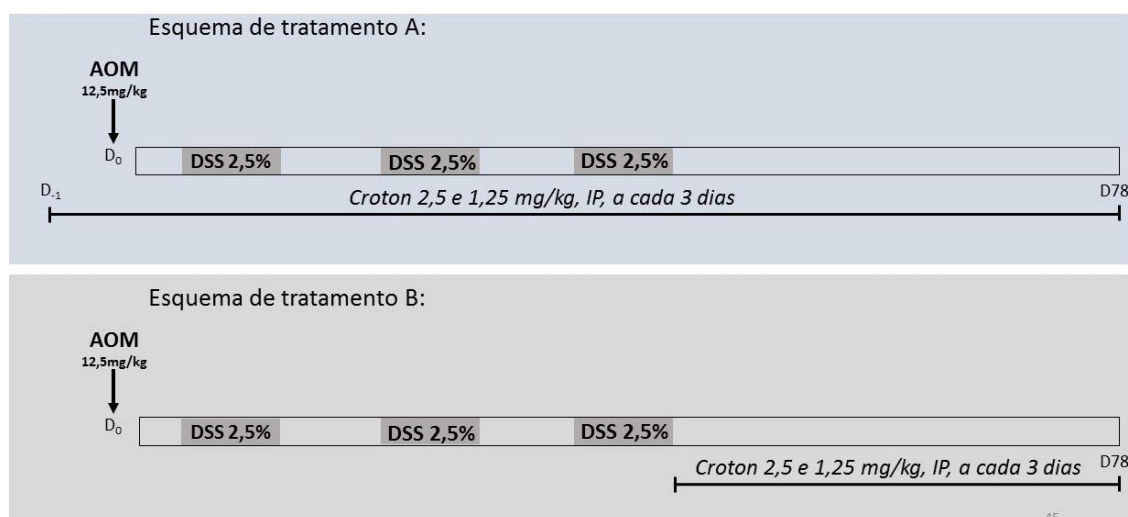
Diversos modelos (de indução química e genética) têm sido desenvolvidos para avaliar colite e neoplasias colorretais (Grivennikov et al., 2012). Neste estudo, utilizou-se a colite aguda induzida por dextran sulfato de sódio (DSS, Affymetrix®), utilizando camundongos machos C56BL6 (n=7/grupo; 8 semanas de idade). O DSS foi dissolvido em água filtrada até concentração final 2,5% e oferecida *ad libitum* para os animais do dia 0 ao dia 5. No sexto e sétimo dia, a solução de DSS foi retirada e os animais receberam água regular. O tratamento com a FAIII6-8 foi realizado intraperitonealmente (5 e 2,5 mg/kg) em dias alternados a partir do dia 0. O grupo controle negativo recebeu apenas o veículo (PBS (tampão fosfato-salina) + 1% Tween 80 - Sigma®). Os animais tiveram seu peso corporal e consistência das fezes avaliadas diariamente até o sétimo dia, quando foram eutanasiados por deslocamento cervical. Assim, os cólons foram removidos e pequenas porções proximais e distais foram processadas para avaliação bioquímica e histológica.

3.2.2. Avaliação da atividade da fração FAIII6-8 sobre carcinogênese associada à inflamação

Camundongos C56BL6 machos (n=7/grupo; 8 semanas de idade), foram injetados intraperitonealmente com 12,5 mg/kg de azoximetano (AOM) no dia 0. Esse pró-carcinógeno, sob ativação metabólica, se liga à guanina e gera a substância O-6-metil-guanina, que induz a formação de tumores na região distal do cólon de roedores e tem sido usado no estudo do câncer colorretal em experimentação animal (Greten et al., 2004). Além disso, AOM causa dano oxidativo e ao DNA, os quais são promovidos pelo agente inflamatório DSS. Portanto o DSS induz colite e promove o câncer colorretal em camundongos. O AOM por si só é capaz de gerar câncer, no entanto o modelo associando AOM/DSS representa maior relevância fisiológica uma vez que em humanos o CCR é frequentemente causado por um fator promotor (inflamação) adicionado à fatores iniciadores (mutações herdadas ou causadas por carcinógenos) (Cheung et al., 2010).

Durante 5 dias, foi oferecido uma solução de 2,5% de DSS (Affymetrix®) *ad libitum* seguidos de 14 dias com água regular. Este ciclo foi repetido por mais duas vezes e, após 78 dias, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. O tratamento com a FAIII6-8 foi realizado intraperitonealmente a cada 3 dias (1,25 e 2,5 mg/kg) em dois diferentes esquemas de tratamento: a partir do dia anterior à administração do AOM até o ultimo dia de experimento (esquema A) e a partir do último dia do último ciclo de DSS até o final do experimento (esquema B) (Fig. 2).

Figura 2: Esquema de tratamento no modelo de carcinogênese associada à colite induzida por AOM/DSS.



AOM (12,5 mg/kg, IP) foi injetado nos animais no dia 1 e o DSS (2,5%) foi oferecido na água dos animais em três ciclos a partir do dia 5. Cada ciclo correspondeu a 5 dias recebendo DSS seguidos de 14 dias recebendo água regular. Os experimentos ocorreram até o dia 78. Os tratamentos com a fração FAIII6-8 foram feitos utilizando-se duas doses (2,5 e 1,25 mg/kg, IP, a cada 3 dias) em dois diferentes esquemas: A: início 1 dia antes da injeção de AOM até o final do experimento e B: a partir do final do último ciclo de DSS até o final do experimento.

Os animais foram observados semanalmente através da avaliação do peso corporal, consistência das fezes e presença de sangue nas mesmas. Os animais eutanasiados tiveram os tumores macroscópicos contados e medidos. Pequenas porções contendo tumores e regiões adjacentes foram processadas para análises bioquímicas e histológicas. Partes dos tumores foram pesadas e mantidas em meio de cultura suplementado, em condições de cultivo, por 24 horas e então o sobrenadante foi recolhido para análise de produção de citocinas.

3.2.3. Avaliação da atividade da fração FAIII6-8 sobre carcinogênese espontânea

Sabendo que células e mediadores inflamatórios estão estimulados durante o desenvolvimento do tumor de cólon, mesmo que este não seja precedido de inflamação, avaliamos a atividade da fração ativa em modelo de câncer colorretal espontâneo. No modelo em questão, o câncer colorretal espontâneo ocorre devido a deleção de ambos alelos do gene supressor de tumor *Apc* (camundongos APC f/f) por ação de CDX2-Cre (camundongos transgênicos com a recombinação Cre ativada por promotor de CDX2, que é expresso em células epiteliais progenitoras do cólon) (Grivennikov et al., 2012). Sem o APC, ocorre o acúmulo de β -catenina no citoplasma que, translocada para o núcleo, se liga ao DNA e pode ativar a transcrição de proto-oncogenes.

Para a indução de tumorigênese, foram utilizados grupos de camundongos CDX2Cre^{ERT2}Apc^{F/F}. Nesse sistema a ativação da recombinase Cre se dá pelo tratamento dos animais com tamoxifeno, pois a recombinase Cre nesta construção está conectada a receptores de estrógeno, que respondem ao tamoxifeno. Após tratamento com tamoxifeno, ocorre a ativação de Cre, que leva a deleção de ambos alelos do gene *Apc* em células expressando CDX2, ou seja, células epiteliais progenitoras do cólon dos animais (Feng et al., 2013). Isso ocorre por que nesses animais, uma sequência essencial do gene *Apc* está sinalizada com sequências de DNA chamadas de *Loxp*, que são reconhecidas pela Cre recombinase ativada pelo tamoxifeno. A Cre recombinase, portanto, deleta a sequência do gene *Apc* que está entre duas sequências *Loxp*, o que leva à deleção de *Apc* em ambos alelos em células expressando CDX2 (Jackstadt & Sansom et al., 2016).

Grupos de 7 camundongos receberam intraperitonealmente 1,5 mg de tamoxifeno/animal (Sigma®, dissolvido em 5% etanol, 95% óleo de milho). Os tratamentos com a FAIII6-8 ocorreram a cada três dias com injeção IP (1,25 e 2,5mg/kg) iniciando 5 dias após a injeção do tamoxifeno (Feng et al., 2013; Vendramini-Costa et al., 2017). Os animais foram avaliados através do peso corporal e análise macroscópica das fezes, e foram eutanasiados após 33 dias de experimento por deslocamento cervical. Os cólons foram dissecados e prosseguiu-se com a contagem e medição dos tumores. Pequenas porções dos tumores e de tecido adjacente foram coletados e processados para análises bioquímicas e histológicas. Porções de tumores também foram pesadas e mantidas em meio de cultura suplementado, em condições de cultivo, por 24 horas e então o sobrenadante foi recolhido para análise de proteínas.

3.3. Análises histológicas

Para as análises histológicas do cólon, eles foram lavados em PBS e fixados no formato “*Swiss-rolls*” em paraformaldeído 4% por 24 horas e depois com etanol 70%. Em seguida, o material foi embebido em parafina, cortado (5 µm) e corado (Hematoxilina e Eosina).

Para a imunohistoquímica, as lâminas foram desparafinizadas em xileno e etanol (100, 70 e 50%) e foi feita a inativação antigênica através da incubação em tampão citrato 10 mM com 0,1% Tween[®] por 1 hora em banho-maria a 94°C. As lâminas foram incubadas com anticorpo primário em PBS contendo 1% SFB (Sigma[®]) e 10% soro de cabra *overnight* a 4°C. Foram utilizados o anticorpo primário Ki67, para avaliação de proliferação (Genetex[®], concentração 1:500) e anticorpo secundário biotinizado anti-rato (Cell Signaling[®], 1:500) que foi adicionado às lâminas e incubados à temperatura ambiente por 1 hora. Seguiu-se com a adição de estreptavidina-HRP (BD Pharmingen[®]) e, após 40 minutos, as lâminas foram marcadas com substrato DAB (Diaminobenzidina 3,3') e contra coradas com hematoxilina. As imagens foram obtidas em foto microscópio (Nikon eclipse 80i).

As imagens obtidas foram analisadas de forma a contabilizar o número de células Ki67 positivas, ou seja, em proliferação. Assim, foi feito o cálculo proporcional da extensão da cripta tomada de células em divisão celular e o valor médio obtido entre animais tratados e grupo controle foi comparado.

3.4. Análise da expressão gênica por PCR em tempo real (RT-PCR)

O RNA total foi extraído das células de tecidos normais e acometidos por tumores através do uso do kit comercial para extração de RNA de acordo com as recomendações do fabricante (Quiagen[®]). A quantificação e qualificação de RNA foi feita em aparelho Nanodrop. Foi utilizado 1 µg de RNA para a conversão para cDNA usando o kit iScript[™] RT Supermix (BioRad[®]). O RT-PCR foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante usando iTaq[™] Universal SYBR Green Supermix (BioRad[®]) no sistema CFX96 BioRad (BioRad[®]). A expressão do mRNA para cada gene foi normalizada pela expressão de L32 como gene controle *housekeeping*. Os dados foram apresentados como a expressão relativa de células não tratadas (para experimentos *in vitro*) ou com cálculo de unidades arbitrárias como $2^{(-Ct\ L32 - \text{gene de interesse})}$ para experimentos *in vivo*. As sequências de *primers* para cada gene foram obtidas no PrimerBlast[®] e estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Sequências de *primers* dos genes analisados.

Gene	Forward	Reverse
L32	5'TTCCTGGTCCACAATGTCAA3'	5'GGCTTTTCGGTTCTTAGAGGA3'
IL-1β	5'TTGACTTCTATCTTGTTGA3'	5'TCAACAAGATAGAAGTCAA3'
COX-2	5'AACCGCATTGCCTCTGAAT3'	5'CATGTTCCAGGAGGATGGAG3'
IL-6	5'CTCTGCAAGAGACTTCCATCCAGT3'	5'GAAGTAGGGAAGGCCGTGG3'
IL-17A	5'TGAGAGCTGCCCCCTTCACTT3'	5'ACGCAGGTGCAGCCCA3'
IL-22	5'CAGGAGGTGGTACCTTTCCTGA3'	5'TCTGGTCGTCACCGCTGAT3'
IL23p19	5'CAGCAGCTCTCTCGGAAT3'	5'ACAACCATCTTCACACTGGATACG3'
iNOS	5'CGAAACGCTTCACTTCCAA3'	5'TGAGCCTATATTGCTGTGGCT 3'
IL-1α	5' CCAGAAGAAAATGAGGTCCG 3'	5' AGCGCTCAAGGAGAAGACC 3'
TGFα	5' TCTGCATGCTCACAGCGAA 3'	5'GCCCAGATTCCCACACTCAGTA 3'
MPO	5' TGCTCTCGAACAAAGAGGGT 3'	5' CTCCTCACCAACCGCTCC 3'
S100A8	5' CCAATTCTCTGAACAAGTTTTCG 3'	5' TCACCATGCCCTCTACAAGA 3'

3.5. Análise de citocinas por ELISA ou Multiplex

Os tumores obtidos dos cólons foram cultivados por 24 horas em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino e antibióticos. O sobrenadante foi coletado, centrifugado e a concentração proteica foi normalizada através do peso tecidual coletado inicialmente ou pela dosagem de proteínas totais (método Bradford). Para a análise do perfil de citocinas através de Sistema multiplex, as amostras foram aplicadas em placas previamente preparadas com *beads* contendo anticorpos primários seguido de procedimentos protocolares do fabricante. As placas foram lidas em aparelho multiplex (Luminex, Affymetrix, Panomics®) e a concentração proteica foi normalizada pelo volume de amostra e concentração de proteínas totais.

Para os experimentos *in vitro* de ativação de macrófagos por LPS o sobrenadante da cultura de células foi coletado e centrifugado. A seguir da coleta dos sobrenadantes, 100 μ L de cada amostra foi adicionada a placa de 96 poços previamente preparadas com os anticorpos primários anti-IL-6. Após 2 horas de incubação à temperatura ambiente, bloqueio e lavagens, foi adicionada estreptavidina-HRP por 30 minutos. Na sequência, o substrato TMB (tetrametilbenzidina) foi adicionado e as placas foram incubadas por 15 minutos sendo a reação enzimática finalizada pela adição de H_3PO_4 1 M. As densidades ópticas foram medidas a 450 nm.

3.6. Análise dos dados

Os *softwares* GraphPad Prism 5® foram utilizados para a construção dos gráficos e para as análises estatísticas. Os resultados foram expressos da forma média \pm erro padrão. A

diferença estatística entre os grupos foi avaliada por *One-Way* ANOVA, seguido de teste de Tukey. Valores com p menor ou igual a 0,05 foram considerados significativos. Quando não significativos matematicamente, os dados foram discutidos com base na tendência.

4. Resultados e discussão

4.1. A fração FAIII6-8 inibe a expressão de IL-6 em macrófagos estimulados por LPS *in vitro*

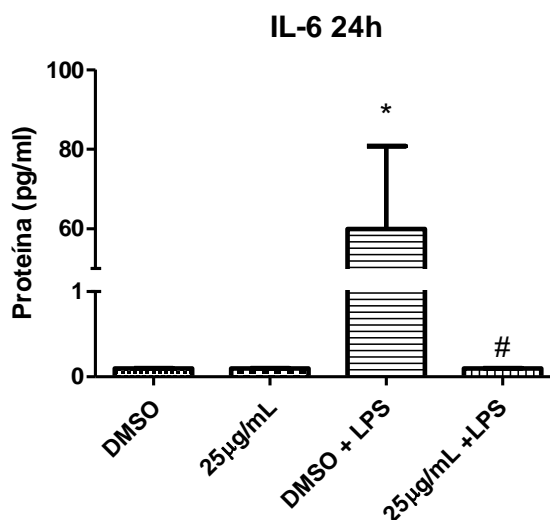
A inflamação é uma característica comum de diversas doenças crônicas e tem sido descrita como um *hallmark* de patologias como obesidade, resistência à insulina, aterosclerose, câncer e outras (Aggarwal et al., 2006; Medzhitov, 2010; Hanahan & Weinberg, 2011; Gasparini et al. 2017). Ela atua como resposta a estímulos internos e externos ao ambiente corporal e, com a perturbação da homeostase tecidual, macrófagos e mastócitos liberam mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas, ROS, os quais irão contribuir para indução da mobilização de leucócitos e infiltração dessas células no local da injúria, estabelecendo o processo inflamatório (Vendramini-Costa et al., 2015; Souza et al., 2017).

Assim, sabendo que os macrófagos desempenham um papel central na patogênese da inflamação, foi avaliada a influência da fração FAIII6-8 na produção de mediadores inflamatórios *in vitro* utilizando macrófagos obtidos de peritonite induzida por tioglicolato em camundongos C57BL6. Em placas, os macrófagos foram tratados com a fração ativa e estimulados com lipopolissacarídeos (LPS), para induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias. Foi avaliada a produção de IL-6, mediador chave diretamente relacionado com a ativação de *toll-like receptor 4* (TLR4).

Foram comparadas as células não tratadas (DMSO), tratadas com FAIII6-8, tratadas apenas com LPS (DMSO+LPS) e tratadas com a fração e LPS (FAIII6-8+LPS) por 6 e 24 horas. No primeiro tempo, os níveis de IL-6 foram indetectáveis no sobrenadante (dados não mostrados). Já após 24 horas de tratamento com 25 µg/mL da fração FAIII6-8, a produção de IL-6 foi inibida completamente (Fig. 3), enquanto que as células estimuladas por LPS e tratadas somente com a fração não apresentaram níveis de IL-6 detectáveis.

Dados não apresentados também indicaram redução da citocina IL-1 α nas mesmas condições experimentais. Além disso, utilizando macrófagos diferenciados a partir de monócitos isolados da medula óssea de camundongos, tanto o pré quanto o pós tratamento mostrou tendência na redução da produção de IL-6 e IL-1 α . No entanto, tratou-se de um resultado preliminar que não foi feito em replicata.

Figure 3. Níveis de citocina pró-inflamatória IL-6 em macrófagos estimulados por LPS tratados ou não com a fração FAIII6-8.



O sobrenadante foi coletado e analisado por ELISA. Valores representam média \pm SEM de $n=3$. * $p < 0,05$ diferença estatística com relação ao DMSO, # $p < 0,05$ diferença estatística com relação ao DMSO estimulado por LPS (*One-way ANOVA* seguido de teste Tukey).

O LPS é um dos componentes principais da membrana externa de bactérias, sendo detectado por receptores do sistema imune inato como os *Toll-like receptors* (TLRs), que são expressos em macrófagos e induzem a produção de citocinas inflamatórias (ex.: TNF, IL-1, IL-6) e quimiocinas (ex.: CCL2 e CXCL8), além de prostaglandinas. Esses mediadores atuam em conjunto em tecidos alvo, promovendo a vascularização local para induzir vasodilatação, extravasamento de neutrófilos e plasma no tecido afetado. Portanto, a produção desses mediadores por macrófagos ativados determina a progressão da condição inflamatória, representando assim um modelo *in vitro* para investigação da atividade anti-inflamatória de novos compostos (Medzhitov, 2010; Gasparrini et al., 2017).

Sabe-se que o mecanismo de estímulo de LPS está relacionado a ativação do TLR4, que leva a ativação de uma série de mediadores pró-inflamatórios, inclusive o fator de transcrição NF- κ B. Neste sistema, a IL-6 atua como uma citocina de “alarme” pois é secretada por macrófagos a fim de expandir a resposta inflamatória regulada por NF- κ B (Takeuchi et al., 1999; Aggarwal et al., 2006; Grivennikov et al., 2009). Assim, a cascata de sinalização de IL-6 mostra forte conexão com vias que são ativadas por citocinas pró-inflamatórias clássicas como TNF e IL-1 β , principalmente por interação com quinases como a p38 e o próprio fator de transcrição NF- κ B (Mauer et al., 2015). Nossos estudos prévios avaliando o envolvimento de NF- κ B em células tumorais tratadas com FAIII6-8 (capítulo 2) indicam que há inibição da

ativação desse fator de transcrição, dado que corrobora esse resultado. Além disso a diminuição da produção de citocinas “alarme” como IL-6 pode indicar a influência do tratamento com FAIII6-8 na sinalização por TLR4.

A família da IL-6 tem um papel chave na promoção e supressão de múltiplas respostas imunes em condições fisiológicas ou patológicas e é um marcador clássico de resposta inflamatória (Hasegawa et al., 2016). Portanto, a inibição da produção de IL-6 após o tratamento com a fração FAIII6-8 reforça a ação anti-inflamatória já observada anteriormente (capítulo 1), sendo este um dado inédito. Estudos mostram que a diminuição da produção de IL-6 indica bloqueio da resposta pró-inflamatória via TLRs, o que pode ser um caminho efetivo na prevenção e no controle de doenças inflamatórias (Boshtam et al., 2017). Assim, o efeito de diminuição da IL-6 causado pelo tratamento com a fração FAIII6-8 pode estar relacionado a essa via, mas estudos adicionais são necessários para comprovação.

4.2. A fração FAIII6-8 previne o desenvolvimento e agressividade de colite aguda

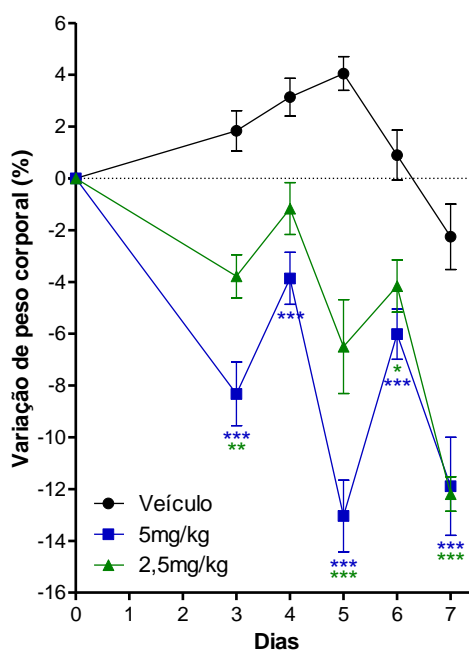
Embora a inflamação seja conhecida por ser uma reação protetiva em resposta à uma irritação, injúria ou infecção, caracterizada por dor, vermelhidão, edema e, algumas vezes, perda de função, ela tem tido uma nova percepção sobre seu papel em uma ampla variedade de doenças, incluindo o câncer (Aggarwal et al., 2006).

Assim, uma típica resposta inflamatória consiste de quatro componentes principais: indutores inflamatórios, os sensores que os detectam, os mediadores inflamatórios induzidos por esses sensores e os tecidos alvo que são afetados pelos mediadores inflamatórios. Cada um desses componentes combinados de diferentes formas tem múltiplas funções nas vias inflamatórias. O tipo de via inflamatória desencadeada vai depender da natureza do estímulo (Medzhitov, 2010).

Nesse contexto, muitos tipos de câncer são relacionados à inflamação, por induzir ou serem precedidos de processo inflamatório. Dentre eles, o câncer associado à colite é precedido por doença inflamatória intestinal (IBD), que envolve resposta inflamatória caracterizada pela perda da barreira mucosa, invasão do componente microbiótico e ativação da resposta imune inata (Grivennikov, 2013; Francescone et al., 2015; Vendramini-Costa et al., 2017). Por essa razão, a busca por novas terapias anti-inflamatórias pode ser uma estratégia para a prevenção e controle do câncer colorretal. Focando nesse propósito, a fração ativa FAIII6-8 de *C. campestris* foi avaliada em modelo de colite aguda induzida por DSS.

A ingestão de DSS (2,5% na água *ad libitum*) induz inflamação colônica (colite) através do rompimento da mucosa intestinal que age como barreira, causando assim a exposição de células do sistema imune da lâmina própria às bactérias ou a produtos bacterianos (Okayasu et al., 2002; Francescone et al., 2014). Isso causa resposta inflamatória caracterizada por perda de peso corporal, infiltração leucocitária no epitélio intestinal, perda do potencial de proliferação das criptas basais e dano tecidual (Neufert et al., 2007; Grivennikov et al., 2013). Durante o experimento, o tratamento com a fração FAIII6-8 também provocou a perda de peso corporal nos animais podendo esse fato estar relacionado ao esquema de tratamento, uma vez que nos experimentos de longa duração não foi observado um efeito colateral tão severo quanto nesses testes (Fig. 4).

Figura 4. Perda de peso corporal dos animais tratados com a fração FAIII6-8 durante o experimento de colite induzida por DSS.



Valores representam média \pm SEM de $n=7$, * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ diferença estatística com relação ao grupo veículo. *One-way* ANOVA seguido de teste Tukey.

A análise imuno-histoquímica foi feita de forma a detectar a expressão de Ki-67 presente em células mitóticas e assim inferir sobre a severidade da colite causada. E, embora tenha sido observada perda de peso (Fig. 4), o tratamento com a fração FAIII6-8 (5 e 2,5 mg/kg) preveniu o dano tecidual induzido por DSS, como mostram as figuras 4, 5 e 6. Nos animais tratados, independente da dose, houve a manutenção da morfologia epitelial e do potencial

proliferativo das criptas basais como pode ser observado nas marcações com H&E e Ki-67, respectivamente.

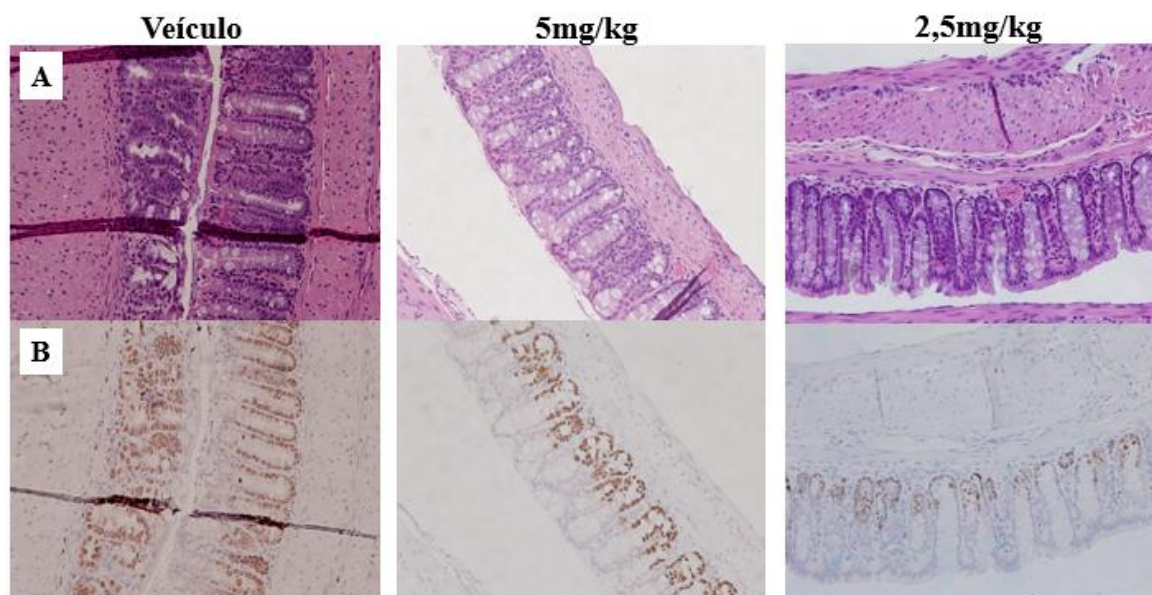
Figura 5. Morfologia e dano tecidual do cólon do grupo veículo exposto ao DSS 2,5%.



Fragmentos de cólon foram fixados com paraformaldeído 4% e processados em parafina para análises morfológicas. As setas amarelas indicam hemorragias pontuais (petéquias) e as setas vermelhas indicam dano tecidual. Os cortes foram feitos 5 μ m de espessura e a coloração por H&E. Aumento de 200x.

O dano tecidual é caracterizado pela perda da morfologia característica e, no caso do epitélio intestinal, perda da morfologia das criptas intestinais (Barker et al., 2009). Além disso, tecidos comprometidos pela colite e outras patologias frequentemente apresentam hemorragias de diferentes gravidades. Essas alterações morfológicas podem ser observadas nas figuras representativas do grupo veículo (5 e 6A). Em alguns casos, a perda do potencial proliferativo das células basais da cripta intestinal está diretamente relacionada ao dano, uma vez que essas células possuem um alto potencial proliferativo com o objetivo de repor constantemente as células expostas da mucosa intestinal (Vendramini-Costa et al., 2017).

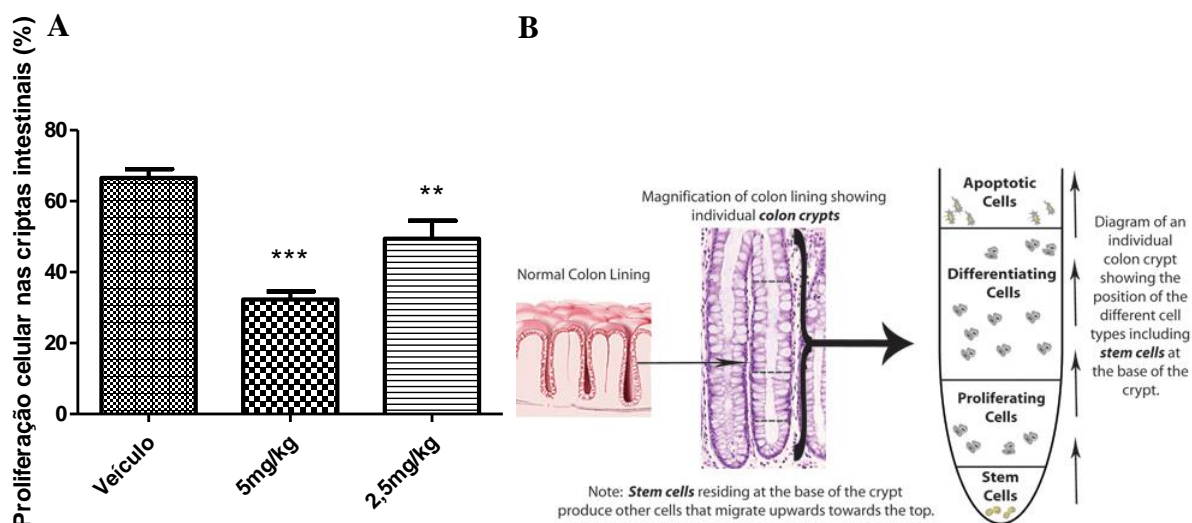
Figura 6. Morfologia, proliferação e dano tecidual dos cólons expostos ao DSS 2,5% de diferentes grupos. Imagens representativas dos grupos controle e tratados com 5 e 2,5 mg/kg da fração FAIII6-8 obtida de *Croton campestris*.



Fragmentos de cólon foram fixados com paraformaldeído 4% e processados em parafina para análises morfológicas (H&E) e imuno-histoquímica. As lâminas foram desparafinizadas e, depois da inativação de antígenos, foram expostas ao anticorpo Ki-67 para análise de proliferação. Os cortes foram feitos 5µm de espessura. A) marcação por H&E. B) Marcação por Ki-67. Aumento de 200x.

Portanto, para os animais tratados com a fração FAIII6-8, o dano foi menos severo visto que as células proliferativas estão presentes na base da cripta e não no topo como ocorre com os animais do grupo controle (Fig. 6B, 7). Vale lembrar que a análise foi feita com base no número de células positivas para Ki67 e não na intensidade da coloração. Como uma menor reposição tecidual foi necessária, significa que a injúria ao tecido foi menor. Nesse sentido, a atividade anti-inflamatória da fração FAIII6-8 tem importante significado num quadro pré-tumorigênico. Isso porque a injúria e a ulceração tecidual induzem respostas de cicatrização e regeneração, as quais levam à migração de células-tronco, sua proliferação aumentada, a cisão da cripta e sua expansão para preencher a mucosa danificada. Se estas células forem portadoras de mutações oncogênicas, ciclos repetitivos de lesão-recuperação poderão instigar a sua proliferação e a formação de tumores (Terzik et al., 2010; Grivennikov et al., 2013;)

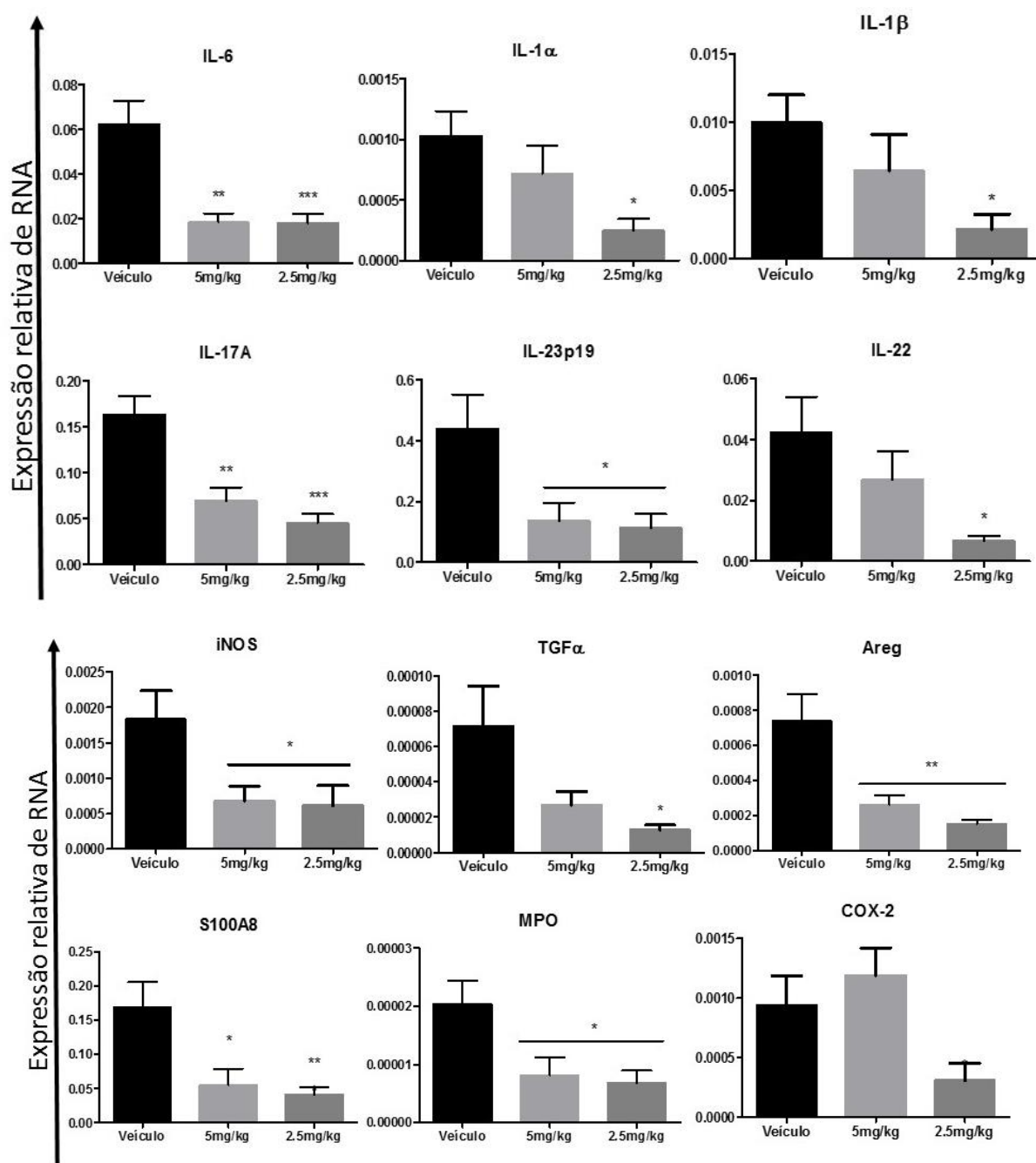
Figura 7. Porção proliferativa das criptas intestinais (expostas ou não ao DSS 2,5%) dos diferentes grupos (controle e tratados com a fração ativa).



A) A proliferação celular no cólon dos animais tratados com a fração FAIII6-8 em comparação ao grupo controle tratado apenas com veículo. As imagens do cólon dos animais foram analisadas de forma a contabilizar o número de células Ki67 positivas e observar a sua posição na cripta, obtendo-se a porcentagem da extensão da cripta tomada de células em divisão celular. B) Diagrama ilustrando a posição dos diferentes tipos celulares na cripta do cólon (Fonte: Johns Hopkins Medicine Website, 2016). Valores representam média \pm SEM de $n=7$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ diferença estatística com relação ao grupo. One-way ANOVA seguido de teste Tukey.

Além da análise histológica, a inflamação foi avaliada através dos níveis de expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores inflamatórios no tecido (Fig.8), que é uma avaliação indireta do aumento de infiltração leucocitária no tecido em decorrência da inflamação. A diminuição da expressão e concentração de citocinas pró-inflamatórias pode estar relacionada à menor infiltração leucocitária, e portanto à manutenção da homeostase do epitélio intestinal e de sua morfofisiologia.

Figura 8. A fração FAIII6-8 de *Croton campestris* inibe a expressão de mediadores pró-inflamatórios em colite aguda induzida por DSS.



Os resultados são expressos como nível relativo de mRNA normalizado pela expressão do gene constitutivo L32. Valores representam média \pm SEM de $n=7$, * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ diferença estatística com relação ao grupo veículo. *One-way* ANOVA seguido de teste Tukey.

O tratamento com a fração FAIII6-8 foi capaz de inibir a expressão de mediadores pró-inflamatórios chave como IL-6 e IL-23. Ambas interleucinas estão diretamente conectadas a resposta imune do tipo Th1. A expressão de proteínas *downstream* a IL-6 e IL-23, tais como

IL-22 e IL-17A, também foi prevenida pelo tratamento. A interleucina IL-23 é um fator regulatório crítico na IBD em humanos e em modelos animais e seus níveis são aumentados em vários tipos de câncer, incluindo CCR (Grivennikov et al., 2013). Estudos prévios mostraram que a transição do adenoma (condição pré tumoral) para o adenocarcinoma no câncer colorretal é dirigido por defeitos da barreira epitelial e a consequente exposição das células pré tumorais à produtos microbianos estimula a produção de IL-23/IL-17, promovendo assim o crescimento tumoral (Grivennikov et al., 2012).

Uma das células mais importantes no ambiente inflamatório são os linfócitos e sua ativação depende do tipo de citocina presente no microambiente onde as células são ativadas. Em um contexto pró tumoral, geralmente eles sofrerão diferenciação em linfócitos TCD4+ com função efetora do tipo TH1 e TH2 (Souza et al., 2010; Antoniou et al., 2015). Os linfócitos TH1 produzem principalmente citocinas IFN- γ , IL-2 e TNF- α e as células TH2 secretam IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Também é possível que células T naive se diferenciem em uma população capaz de secretar IL-17, os linfócitos TH17 (Park et al., 2005). A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória produzida por células TH17 e tem papel importante na resposta imune a certos patógenos, como bactérias extracelulares e fungos, e na patogênese de doenças autoimunes. A diferenciação dessas células depende de TGF- β e IL-6 e também do fator de transcrição ROR γ t, e a manutenção dos linfócitos TH17 é regulada por IL-23 (Ivanov et al., 2007; Blake & Teng, 2015). A atividade pró-inflamatória das células TH17 está relacionada à sua capacidade de induzir a produção de mediadores como IL-1, IL-6, TNF- α , CCL2, CCL7, CCL20, CXCL1, CXCL8 e metaloproteinasas (MMP) por células endoteliais e macrófagos (Park et al., 2005). Diversos estudos vêm apontando a importância da resposta inflamatória mediada por linfócitos TH17 em doenças inflamatórias como a IBD (Kmiec et al., 2017; Blake & Teng, 2015; Shan et al., 2006).

Além do eixo IL-23/IL-17A, outras citocinas se apresentaram inibidas pela fração FAIII6-8 como IL-1 α and IL-1 β , que estão diretamente ligadas à ativação de NF- κ B. Esse fator de transcrição está hiperativado em células imunes, epiteliais e cancerígenas tanto na IBD quanto no CCR (Grivennikov & Karin, 2010). O NF- κ B modula a expressão de uma ampla gama de genes relacionados à proliferação, inflamação e sobrevivência (Vendramini-Costa & Carvalho, 2012). Conforme observado anteriormente (capítulo 2) a fração FAIII6-8 foi capaz de inibir a via do NF- κ B em células tumorais de pulmão, corroborando o resultado aqui observado. Também foi observada diminuição da expressão de TGF- α (*transforming growth factor alfa*), um membro da família do fator de crescimento epidermal (EGF-*epidermal growth*

factor), o qual ativa vias de sinalização para a proliferação celular, ou seja, um importante passo na tumorigênese (Tang et al, 2016). Como essa proteína também é produzida por macrófagos, pode-se sugerir que essas células estejam em número reduzido no tecido de animais tratados visto a atividade anti-inflamatória da fração.

Também foi observada a redução na expressão de mieloperoxidase (MPO), uma enzima sinalizadora de neutrófilos ativados, o que indica redução na presença dessas células nos animais tratados e, portanto, um menor índice inflamatório. Além disso, esse dado também é compatível com dados prévios de atividade anti-inflamatória de frações ativas de *C. campestris* em modelo de edema de orelha (Capítulo 1). Esse dado é consistente uma vez que IL-17 promove o recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da inflamação. A IL-17 também leva ao aumento de COX-2 e iNOS que, compatível com a redução de sua expressão, também estão reduzidos (Iwacura et al., 2008; Cua & Tato, 2010; Wang et al., 2012).

O Anfiregulina (Areg) é membro da família do EGF e, assim como os outros membros da família, medeiam funções biológicas de células epiteliais e mesenquimais através dos receptores EGFR. Esse tipo de sinalização é essencial para a resposta regenerativa do dano à mucosa gastrointestinal. Nesse sentido, num cenário de remodelamento tecidual, IL-1 β e TNF α induzem a expressão de Areg (Nishimura et al., 2008). Podemos estabelecer essa relação para o experimento de colite, uma vez que houve diminuição da expressão ambos, IL-1 β e de Areg no cólon dos animais tratados com FAIII6-8. O Areg apresenta expressão aumentada e atua como fator pró-oncogênico em diversos tipos de câncer como o de cólon, mama, pulmão, fígado entre outros. Isso está relacionado ao fato da superexpressão de Areg prover sinais de sobrevivência e crescimento autossustentado nesses tumores. Assim, correlacionando suas características mitogênicas e sua participação em processos inflamatórios, podemos ligar a participação desse fator à interface câncer-inflamação (Fukata et al., 2007; Elinav et al., 2013; Berasain & Avila, 2014). Dessa maneira, a diminuição da expressão desse fator é um ponto positivo na atividade anti-inflamatória demonstrada pela fração FAIII6-8.

A proteína S100 *calcium-binding protein* A8 (S100A8) é uma proteína imunogênica secretada por neutrófilos e tem importante papel pró-inflamatório como mediador da inflamação aguda e crônica, ou seja, apresenta função semelhante a citocinas. Somado a isso, sua expressão aumentada em diversos tipos de câncer, têm associado essa proteína à relação câncer-inflamação (Gebhardt et al., 2006). Além disso, S100A8 é um tipo de padrão molecular associado a dano (*damage-associated molecular patterns* - DAMP) que tem sido clinicamente associado como um biomarcador de doenças inflamatórias intestinais (Boyapati et al., 2016). Nesse contexto, o receptor RAGE é um receptor multi-ligante da família das imunoglobulinas

associado ao câncer e às patologias inflamatórias, cuja interação com mediadores pró-inflamatórios como S100A8 pode levar a ativação de NF- κ B (Turovskaya et al., 2008). Por isso, a diminuição da expressão de S100A8 está de acordo com a atividade anti-inflamatória observada para a fração FAIII6-8 inclusive quando relacionamos com os dados mostrados no capítulo 2 que apresentam a redução da ativação de NF- κ B em células tumorais de pulmão.

Portanto, visto o ambiente inflamatório como um componente crucial para a indução, promoção e progressão tumoral em tumores que se desenvolvem a partir de condições de inflamação crônica, a modulação do ambiente inflamatório promovida pelo tratamento com os componentes ativos de *Croton campestris* sugerem potencial atuação na prevenção do câncer associado à colite (CAC), sendo esse um dado inédito para a espécie (Greten et al., 2004; Vendramini-Costa e Carvalho, 2012; Grivennikov, 2013; Francescone et al., 2014).

Conforme descrito anteriormente (Capítulo 1), a fração FAIII6-8 é rica em ácido gálico. Um grupo de pesquisas que tem realizado estudos utilizando essa substância também reportou sua atividade inibitória na colite murina. Os autores reportaram a redução da infiltração de neutrófilos, redução da expressão de iNOX, COX-2, IL-21 e IL-23 e a diminuição da ativação de NF- κ B, dados que reforçam o resultado obtido no corrente estudo (Pandurangan et al., 2015a; Pandurangan et al., 2015b).

Com base nesses resultados, as atividades terapêutica e preventiva da fração FAIII6-8 foram avaliadas em carcinogênese de cólon associada à colite induzida pela associação AOM/DSS.

4.3. A fração FAIII6-8 inibe o desenvolvimento tumoral em carcinogênese associada à colite induzida por associação de AOM/DSS

Aproximadamente 2% dos casos de câncer colorretal estão ligados à inflamação pré-existente (Grivennikov & Karin, 2010; Grivennikov et al., 2012; Francescone et al., 2015; Wang & Karin, 2015). Nesse sentido um grande número de modelos (incluindo modelos genéticos e quimicamente induzidos) tem sido desenvolvido para avaliar colite e neoplasia colorretal focando no estudo da patogênese desses dois importantes problemas de saúde (Neufert et al., 2007; Kuraishy et al., 2011; Thaker et al., 2012; Grivennikov, 2013; Vendramini-Costa et al., 2017).

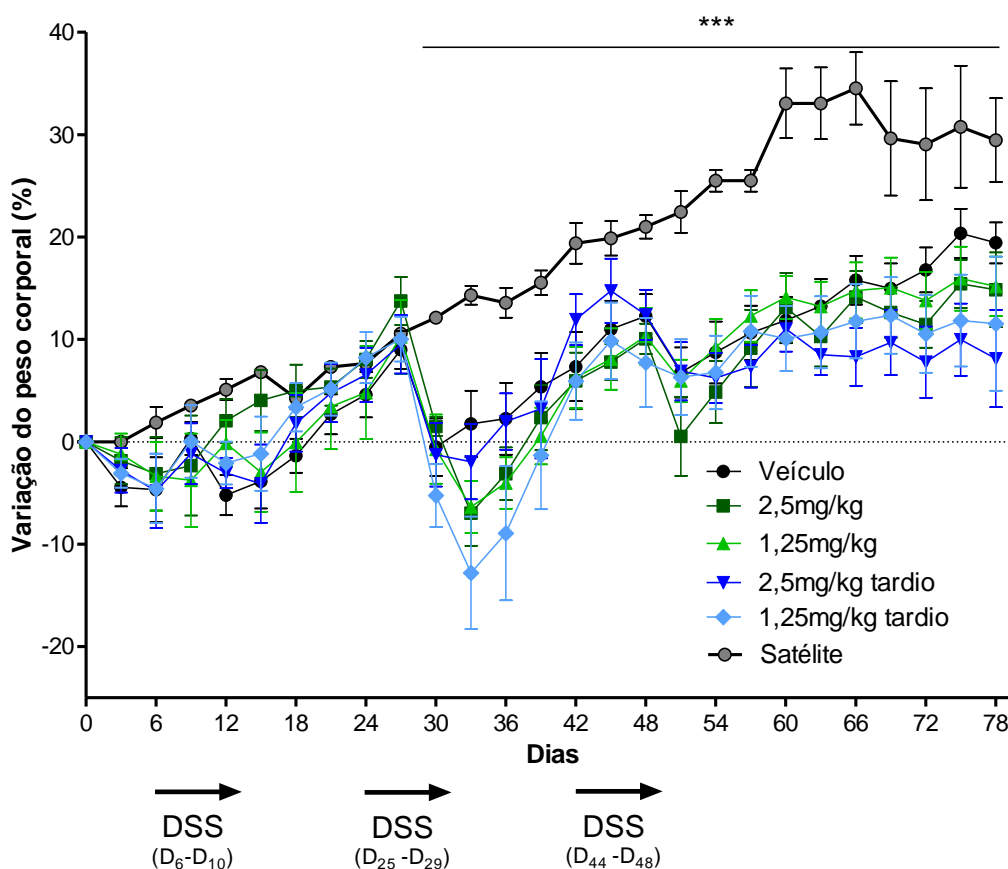
A coadministração de DSS e azoximetano (AOM) é reportada por induzir neoplasia colorretal em camundongos, variando entre displasia de alto grau à carcinoma invasivo em 14 semanas (Tanaka et al., 2003; Grivennikov et al., 2009). O DSS age como promotor, pois sendo muito tóxico para as células epiteliais, sua ação resulta em colite severa caracterizada por

diarreia sanguinolenta (Neufert et al., 2007; Grivennikov, 2013). O AOM é um pró-carcinógeno que, sob ativação metabólica, leva à formação de O-6-metil-guanina no DNA através da alquilação do átomo de oxigênio da molécula de guanina (Fahrer & Kaina, 2013). Assim, AOM induz formação de tumores na porção distal do cólon de roedores e é comumente utilizado para o estudo do câncer colorretal em animais experimentais (Greten et al., 2004). Esse modelo de carcinogênese mostra expressão aberrante do gene supressor de tumor APC (*adenomatosis polyposis coli*), além de mutações e localização alterada de β -catenina, proteína que está envolvida na via de sinalização fundamental para a renovação intestinal sendo, portanto, um crítico regulador entre a proliferação celular normal e maligna (Francescone et al., 2015).

Assim, a carcinogênese associada à colite foi induzida pela administração de AOM/DSS em camundongos C57BL6 e, então, pôde-se explorar a atividade preventiva e terapêutica da fração FAIII6-8 de *Croton campestris*. Para esse experimento os animais foram injetados com AOM e após 5 dias, o DSS foi oferecido na água em três ciclos como explica a figura 2. Os tratamentos seguiram dois diferentes esquemas: A, quando os animais foram tratados 1 dia antes da injeção do AOM até o final do experimento e B, quando os animais foram tratados desde o final do último ciclo de DSS até o final do experimento que durou um total de 78 dias.

Em comparação com o grupo satélite (sem AOM/DSS), todos os grupos experimentais apresentaram perda de peso corporal sendo que o tratamento com a fração FAIII6-8 não foi capaz de prevenir essa perda (Fig. 9), não havendo diferença estatística entre o grupo dos animais tratados com o veículo e o grupo dos animais tratados com a fração ativa.

Figura 9. Variação de peso corporal durante os 78 dias de experimento de carcinogênese associada à colite.

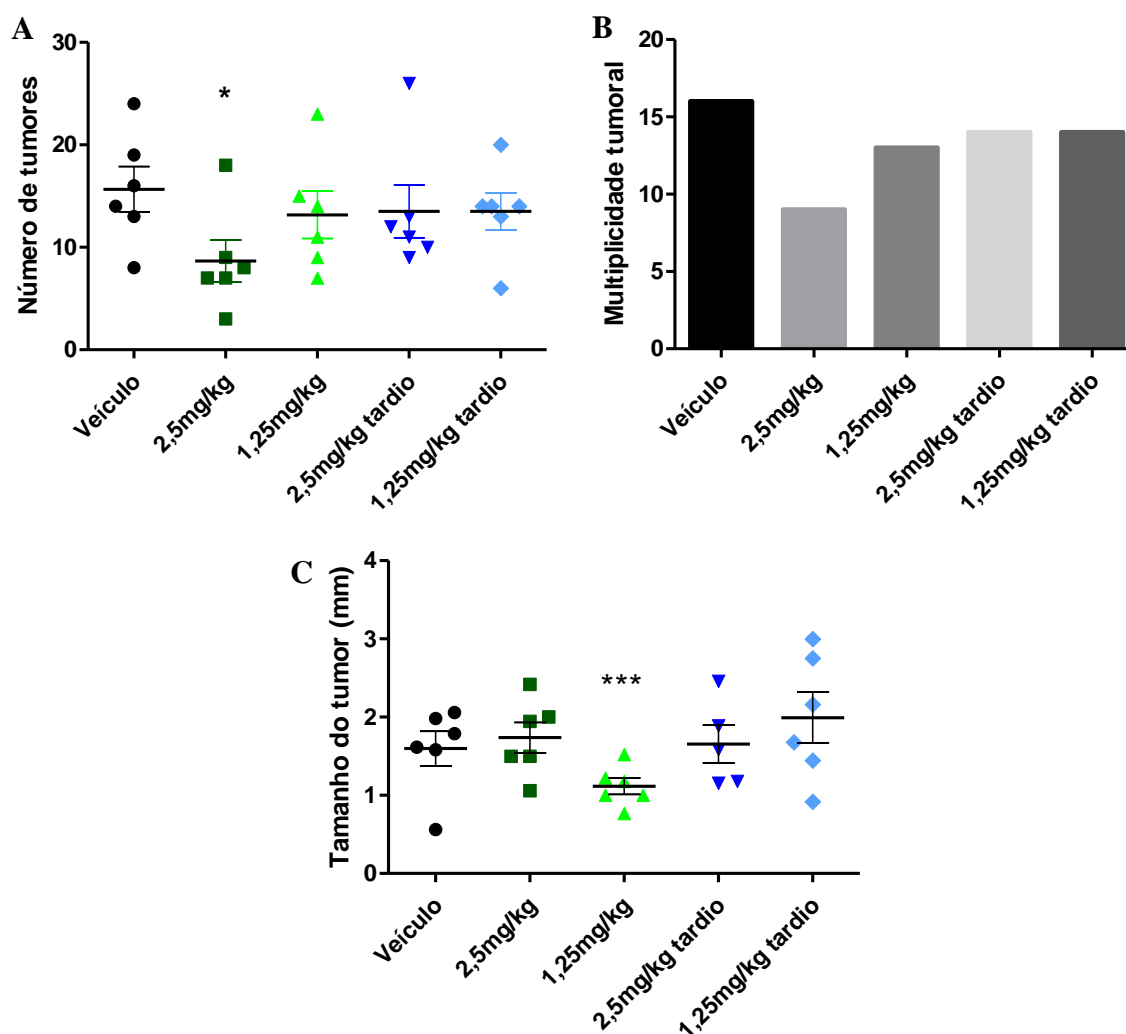


Grupos 1,25 e 2,5mg/kg foram tratados via IP a cada 3 dias com início 1 dia antes da injeção de AOM até o final do experimento. Os grupos 1,25 e 2,5 mg/kg “tardio” receberam tratamento via IP a cada 3 dias apenas a partir do final do último ciclo de DSS até o final do experimento. Valores representam média \pm SEM de $n=7$, *** $p<0,001$, diferença estatística com relação ao grupo satélite. Não houve diferença estatística entre o grupo veículo e os grupos tratados. *One-way* ANOVA seguido de teste de Tukey.

O tratamento com a fração FAIII6-8 obtida de *Croton campestris* inibiu o desenvolvimento tumoral diminuindo significativamente o número de tumores para a dose de 2,5 mg/kg e o tamanho para a dose de 1,25 mg/kg. No esquema A de tratamento, a fração ativa foi capaz de prevenir a multiplicação e aumento do tumor, ou seja, os animais tratados tiveram menor incidência no desenvolvimento de CAC. No entanto, no esquema B de tratamento (tardio) não houve diferença em ambos número e tamanho dos tumores quando comparados os grupos tratados e o grupo controle (Fig. 10). Na figura 11, imagens representativas dos cólons dos animais experimentais mostram a menor quantidade de tumores nos animais dos grupos tratados. Também é possível ver que os grupos tratados tardiamente apresentam as regiões acometidas pelos tumores de forma similar ao grupo tratado com o veículo.

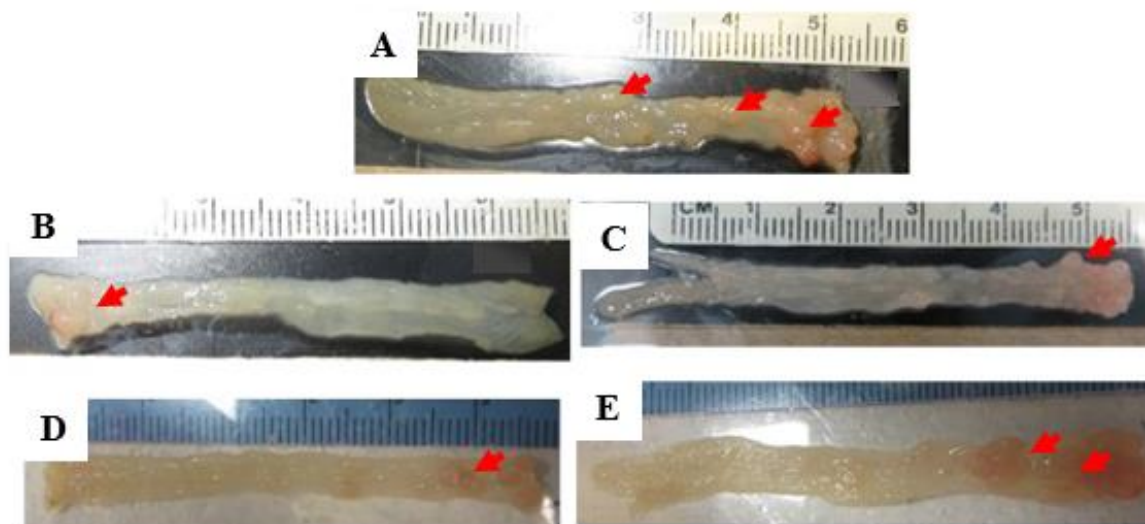
Esse resultado reforça a atividade anti-inflamatória da fração FAIII-6-8 nesse modelo, uma vez que, estabelecido o tumor após a promoção inflamatória, a fração não se mostrou efetiva. Assim, pode-se concluir que o tratamento é essencial nos estágios precoces do processo carcinogênico e que seu efeito protetivo durante a fase de promoção tumoral pode ser importante para a prevenção ao tumor. Portanto, conforme discutido anteriormente, o efeito anti-inflamatório da fração FAIII6-8 é elementar nesse modelo de CCR, visto que o DSS age como promotor da tumorigênese.

Figura 10. A fração FAIII6-8 obtida de *Croton campestris* previne o desenvolvimento da carcinogênese associada à colite induzida por AOM/DSS.



Grupos 2,5 e 1,25mg/kg foram tratados via IP a cada 3 dias com início 1 dia antes da injeção de AOM até o final do experimento (78 dias). Os grupos 2,5 e 1,25 mg/kg “tardio” receberam tratamento via IP a cada 3 dias apenas a partir do final do último ciclo de DSS até o final do experimento. **A)** Média do número de tumores para cada grupo ao final do experimento. **B)** Multiplicidade tumoral (média da soma de todos os diâmetros por grupo ao final do experimento). **C)** Média do tamanho dos tumores por grupo no final do experimento. Valores representam média ± SEM de n=6, *p<0,05 e ***p<0,001 diferença estatística com relação ao grupo veículo. *One-way* ANOVA seguido de teste Tukey.

Figura 11. A fração FAIII6-8 obtida de *Croton campestris* previne o desenvolvimento tumoral em carcinogênese de cólon associada à colite induzida por AOM/DSS.



Imagens representativas do grupo veículo (A), tratado com 2,5mg/kg (B), tratado com 1,25mg/kg (C), tratado tardiamente com 2,5 mg/kg (D) e tratado tardiamente com 1,25mg/kg (E). As setas indicam tumores.

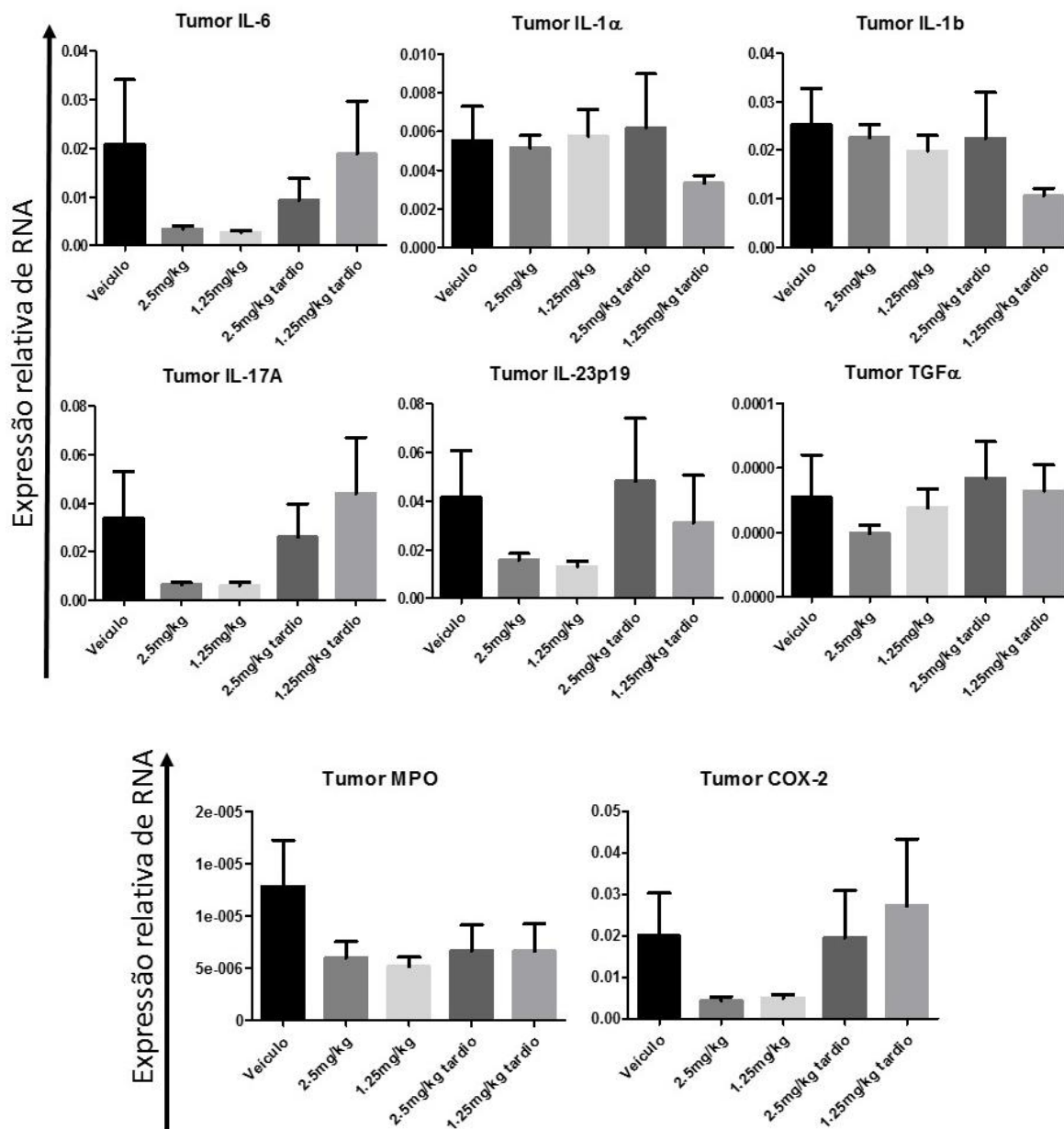
Enquanto a inflamação aguda é parte de uma resposta de defesa, a inflamação crônica pode levar ao diabetes, doenças cardiovasculares, pulmonárias, neurológicas e ao câncer. Assim diversos genes pró-inflamatórios têm sido identificados como mediadores críticos na supressão de apoptose, proliferação, angiogênese, invasão e metástase, eventos que caracterizam a progressão tumoral. Dentre os produtos desses genes estão TNF e família, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18, quimiocinas, MMP-9, VEGF, COX-2 e 5-LOX. A expressão desses genes é principalmente regulada pelo fator de transcrição NF- κ B, que está constitutivamente ativo na maioria dos tumores e é induzido por carcinógenos (Aggarwal et al., 2006; Boshtam et al., 2017).

Visto que no experimento de colite aguda a fração diminuiu a expressão gênica de citocinas relacionadas à resposta imune TH17, no experimento de carcinogênese induzida por AOM/DSS observou-se um perfil similar, com a tendência à redução na expressão de IL-6, IL-17A e IL-23 (Fig. 12). Esse dado é coerente, uma vez que a diferenciação dos linfócitos em células TH17 depende de TGF- β e IL-6 e também do fator de transcrição ROR γ t, sendo a manutenção dessas células regulada por IL-23 (Blake & Teng, 2015). Assim, a atividade pró-inflamatória das células TH17 no contexto do câncer de cólon está relacionada à sua capacidade de induzir a produção de mediadores como IL-1 e IL-6, que está menos expressa nos animais

tratados com FAIII-8. Assim, sabe-se que IL-23 e IL-6 são produzidas pelo sistema imune inato, ou seja, macrófagos e células dendríticas. Dessa forma, a menor infiltração de neutrófilos sugerida pela diminuição da expressão de MPO, junto com provável diminuição no número de macrófagos e outras células inflamatórias, justifica a menor produção de IL-23 e IL-6.

De acordo com o número e tamanho dos tumores, a diminuição da expressão de citocinas foi observada principalmente para os animais tratados no esquema A. Foi também observada a diminuição na expressão de TGF- α , um importante fator para as vias de proliferação celular. Também relacionado à diminuição de TH17, houve a redução da expressão de MPO uma vez que esse tipo de resposta inflamatória promove o recrutamento de neutrófilos e monócitos para o sítio inflamado. Podemos observar também a tendência na diminuição da expressão de COX-2 (Fig. 12). Essa enzima está envolvida nos processos inflamatórios e encontra-se aumentada no câncer colorretal (Wang et al., 2009). É componente da via do ácido araquidônico e seus produtos, incluindo a prostaglandina (PGE2), são potentes mediadores inflamatórios que promovem o crescimento tumoral e metástase através do estímulo da proliferação celular, invasão e angiogênese (Mann et al., 2005). A COX-2 também pode ser induzida por NF-kB e, quando superativada, pode contribuir para a patogênese do câncer (Wang et al., 2009). Assim, a diminuição da expressão de COX-2 observada para os animais tratados com a fração FAIII6-8 também é coerente com as outras citocinas inibidas, bem como a redução da expressão de NK-kB já apresentada anteriormente (capítulo 2).

Figure 12. A fração FAIII6-8 obtida de *Croton campestris* inibe a expressão de mediadores pró-inflamatórios em carcinogênese de cólon associada à colite induzida por AOM/DSS.

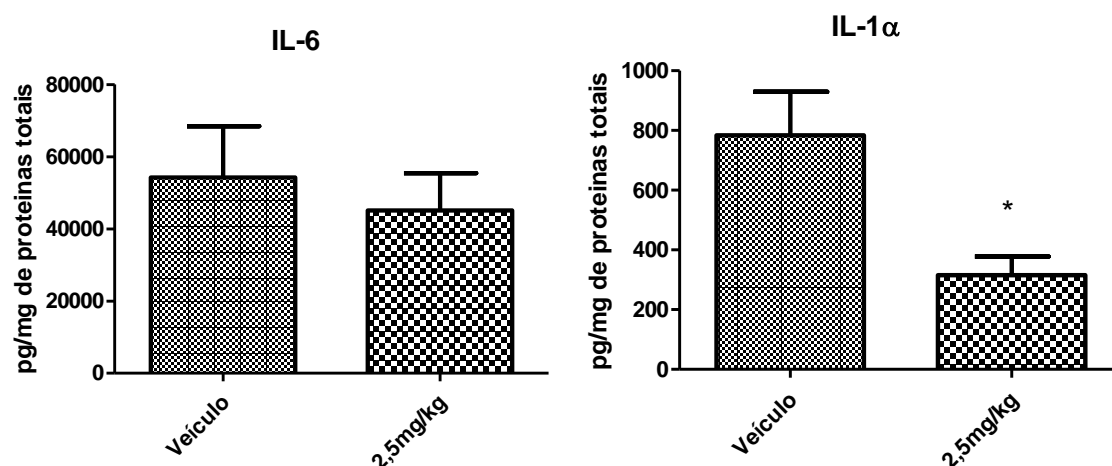


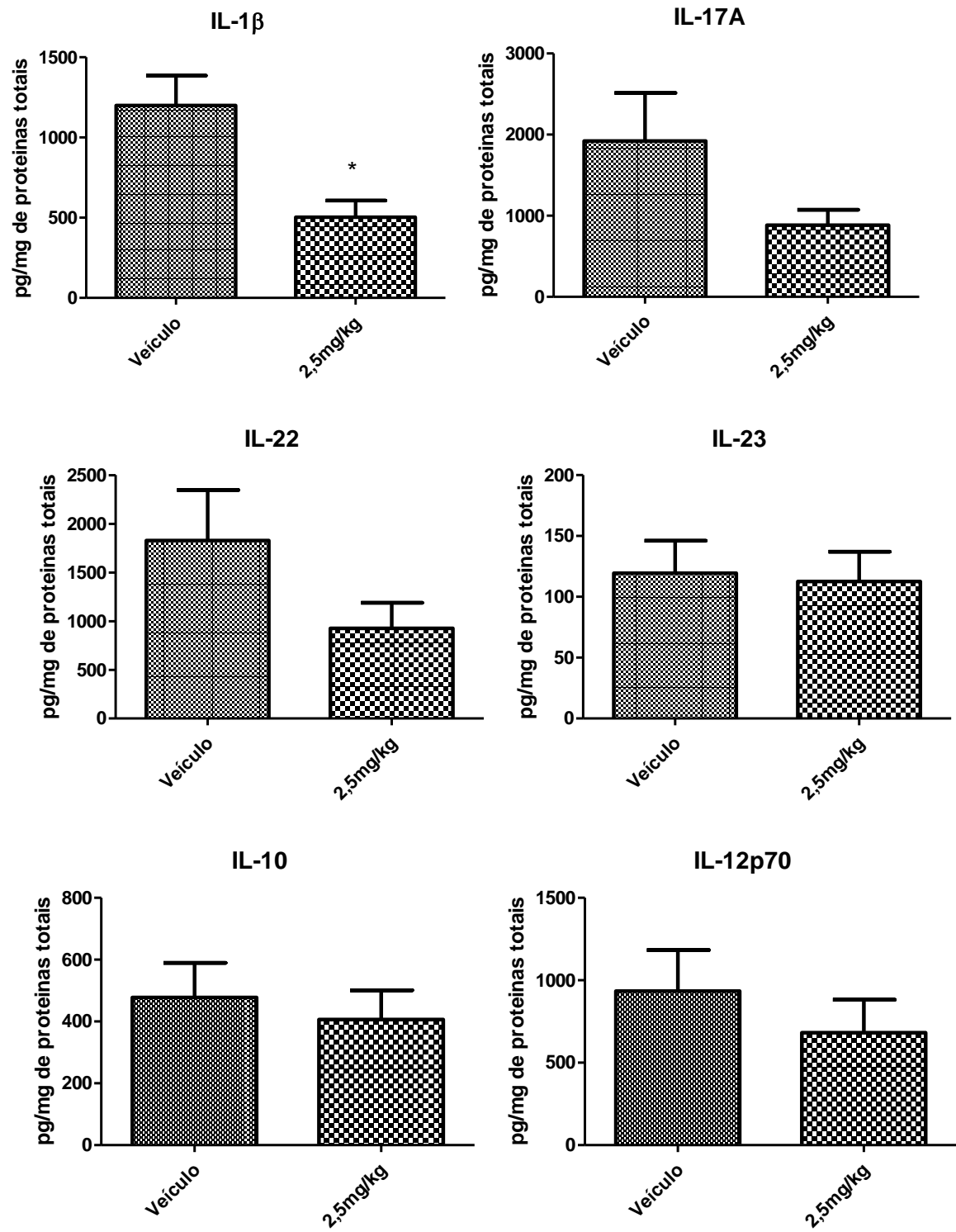
Expressão gênica do tecido tumoral do cólon de camundongos tratados com veículo (PBS+1%Tween80) ou fração FAIII6-8 (2,5 e 1,25 mg/kg, IP, a cada três dias no esquema A ou B). Os resultados são expressos como nível relativo de mRNA normalizado pela expressão do gene constitutivo L32. Valores representam média \pm SEM de n=6. O teste estatístico *One-way* ANOVA seguido de teste Tukey não apresentou significância, no entanto, é possível observar uma tendência.

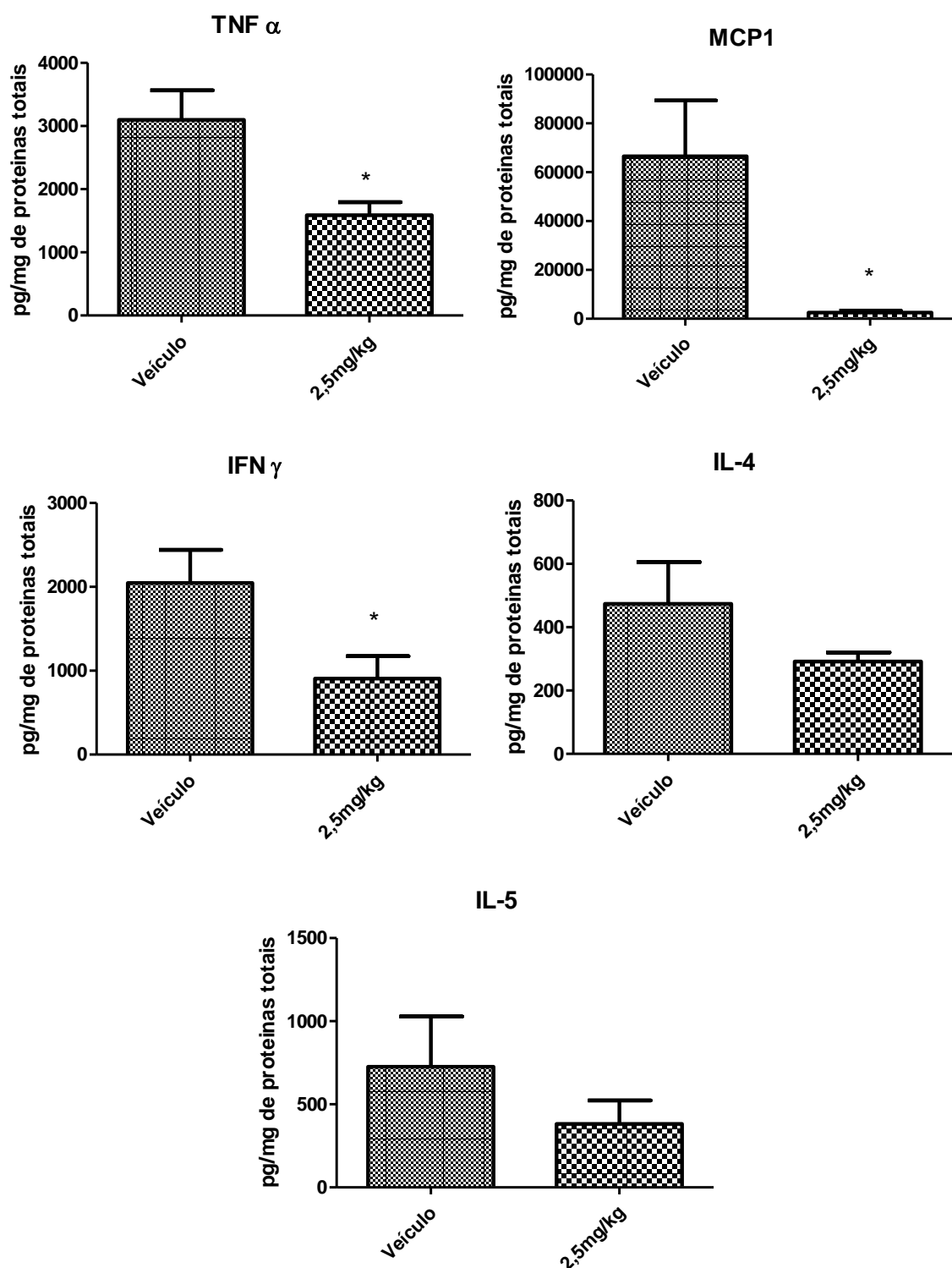
Após a extração do cólon, os tumores foram coletados e cultivados por 24 horas. Na sequência o sobrenadante foi coletado para que fossem avaliadas a produção de citocinas

(Fig. 13). Diferentemente da expressão de mRNA, os tumores dos animais tratados com a menor dose da fração FAIII6-8 no esquema A apresentaram diminuição na produção de IL-1 α e IL-1 β , embora a concentração de IL-6 não estivesse diminuída. Os tumores de animais tratados também produziram menos IFN γ e TNF α , o que pode estar relacionados à redução do número de células imunes no microambiente tumoral (Chang et al., 2013; Curovik et al., 2013). Outra proteína cuja concentração estava diminuída é a MCP1 ou CCL2 (*chemokine C-C motif ligand 2* ou *monocyte chemoattractant protein 1*) que é responsável pelo recrutamento de células inflamatórias como monócitos, células T de memória e células dendríticas, as quais participam do ambiente inflamatório (Wang et al., 2016b). Além disso, a redução de MCP1 e de TNF α é compatível com a diminuição da resposta pró-inflamatória das células TH17 que induzem células endoteliais e macrófagos à produzirem esses mediadores (Park et al., 2005). Outro dado mostra a tendência na diminuição de IL-4 e IL-5, que podem indicar também a inibição de resposta do tipo TH2, o que, por outro lado, também poderia levar a redução de IL-10, resultado não observado. Esse dado suporta a ideia de que existe menor infiltração de células inflamatórias frente ao tratamento com a fração FAIII6-8 em estágios iniciais da carcinogênese e que, portanto, há menor produção de citocinas relacionadas principalmente com o eixo IL-6/IL-23, como IL-22 e IL-17A, via extremamente importante no contexto do câncer colorretal.

Figure 13. A fração FAIII6-8 obtida de *Croton campestris* diminui a produção de citocinas pelo tumor. Produção de citocinas pelos tumores do modelo induzido por AOM/DSS dos animais tratados com veículo (PBS+1% Tween80) ou fração FAIII6-8 2,5 mg/kg, a cada três dias no esquema A.







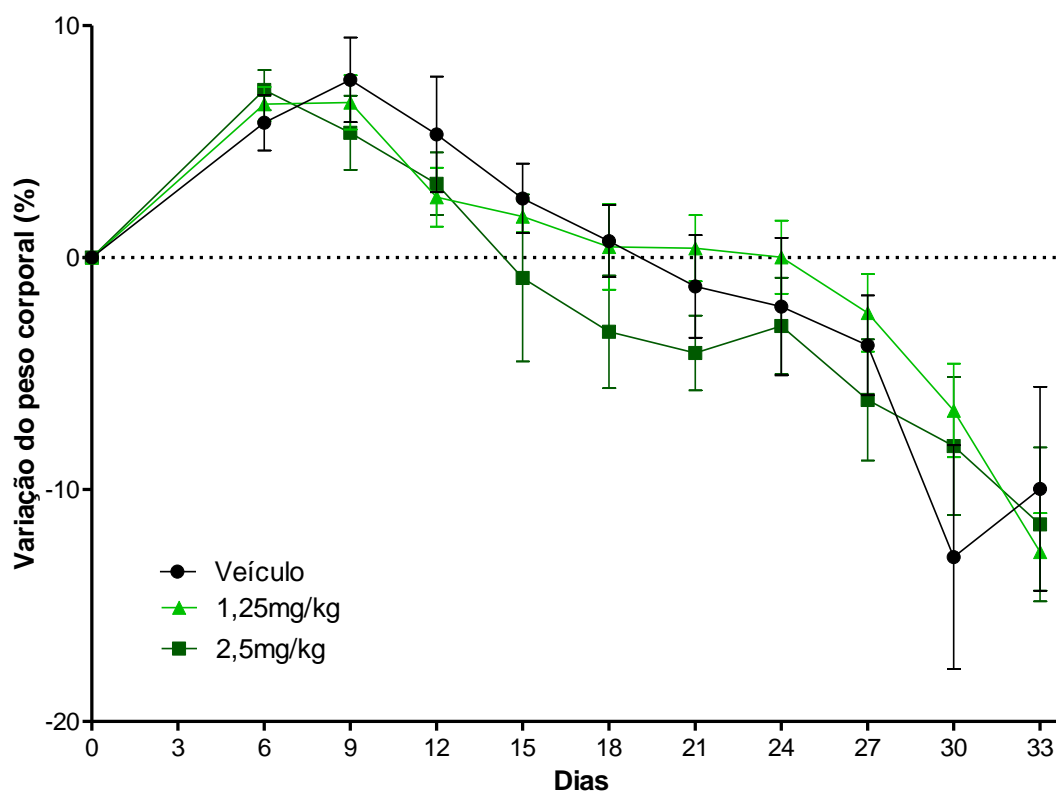
Tumores foram cultivados por 24 horas em meio DMEM completo e o sobrenadante foi coletado e processado para quantificação dos níveis de proteína por ELISA-Multiplex. Valores representam média \pm SEM de $n=6$, * $p<0,05$ e *** $p<0,001$ diferença estatística com relação ao grupo veículo. *One-way* ANOVA seguido de teste Tukey.

Assim, visto a conexão de diversas interleucina inflamatórias com a tumorigênese e os resultados do experimento de colite, sugerimos que a fração FAIII6-8 de *Croton campestris* pode ter contribuído para a diminuição da produção de citocinas-chave do processo inflamatório. Dessa forma, a fração quando administrada nas fases iniciais do processo carcinogênico inibiu a inflamação necessária para a promoção tumoral, reduzindo a agressividade da patologia através da modulação do microambiente inflamatório. Esses dados de atividade farmacológica são inéditos para a espécie vegetal em estudo sendo a primeira vez que uma fração rica em ácido gálico é reportada por apresentar atividade antitumoral em modelo de carcinogênese de cólon.

4.4. A fração FAIII6-8 diminui o tamanho dos tumores em modelo de carcinogênese colorretal espontânea

Células inflamatórias e citocinas estão estimuladas durante o desenvolvimento tumoral, ainda que o surgimento do tumor não seja precedido por inflamação evidenciada, como nos casos de CCR esporádico. Dessa forma, com objetivo de verificar o potencial preventivo da fração FAIII6-8 de *Croton campestris* em modelo de CCR não precedido por inflamação (colite), foram usados camundongos CDX2Cre-^{ERT2}Apc^{F/F}. Geralmente, levaria cerca de seis meses para que os animais desenvolvessem CCR, no entanto esse processo pode ser acelerado através da deleção condicional do gene APC com injeções de Tamoxifeno (1,5 mg/camundongo). Com essa metodologia, pode-se observar a formação de tumores após 30 dias da indução da deleção. Assim, após tratamento com tamoxifeno, ocorre a ativação de Cre, que leva a deleção de ambos alelos do gene supressor tumoral Apc em células expressando CDX2, ou seja, células epiteliais progenitoras do cólon dos animais, consequentemente permitindo o desenvolvimento da colônia tumoral.

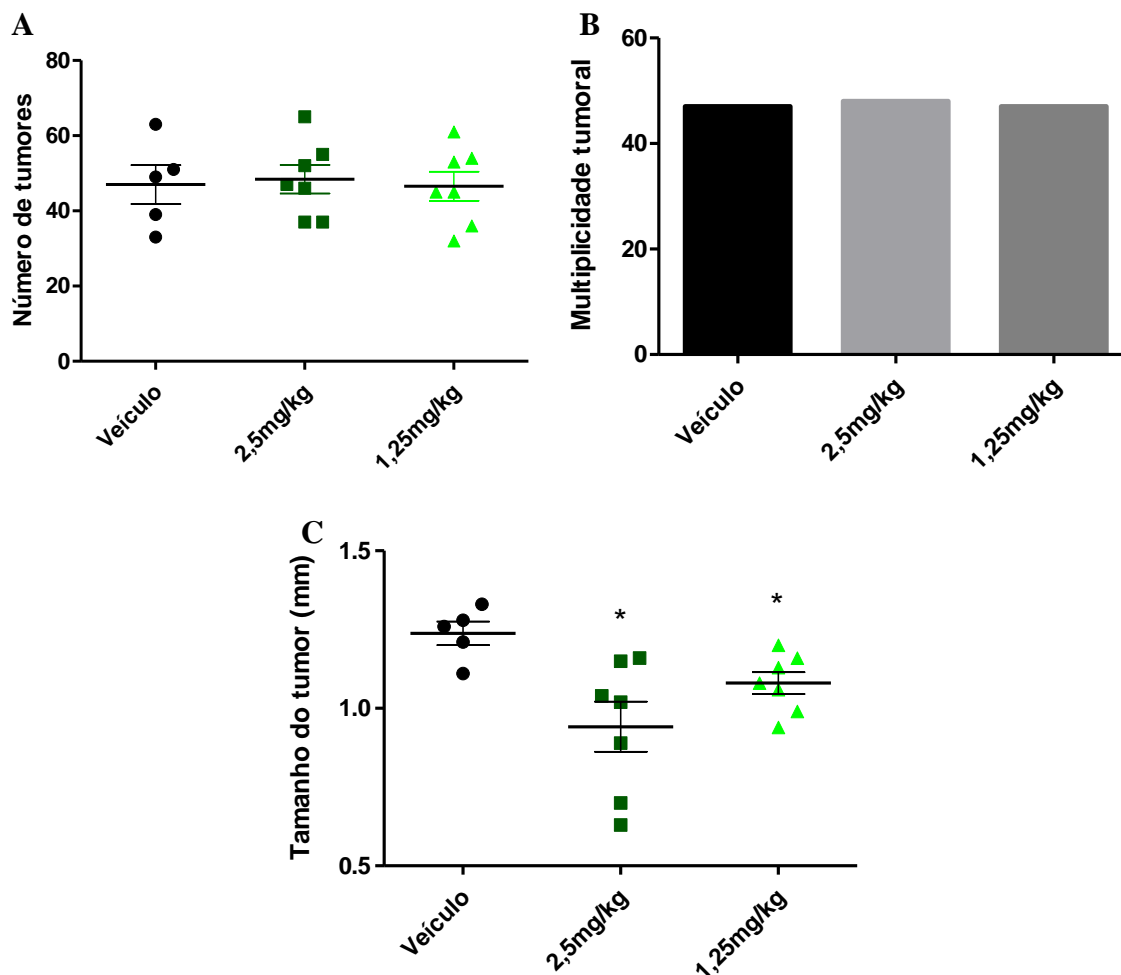
Figura 14. Variação de peso corporal durante os 33 dias de experimento de CCR espontâneo.



Grupos 1,25 e 2,5 mg/kg foram tratados a cada 3 dias, com início 5 dias após a injeção de tamoxifeno, até o final do experimento. Valores representam média \pm SEM de $n=7$. O teste estatístico One-way ANOVA seguido de teste Tukey não apresentou significância.

Os animais de todos os grupos apresentaram perda de peso (Fig. 14) e não houve diferença estatística entre o grupo veículo e os grupos tratados com relação ao número de tumores. No entanto, o tamanho dos tumores foi menor para os animais tratados (Fig. 15).

Figura 15. A fração FAIII6-8 obtida de *Croton campestris* diminuiu o tamanho tumoral em modelo de CCR espontâneo baseado na deleção condicional do supressor de tumor APC.



Animais receberam Tamoxifeno, 0,5 mg/camundongo, IP para induzir o gene knockout, então foram tratados com veículo (PBS + 1% Tween 80) ou fração FAIII6-8 (2,5 e 1,25 mg/kg, IP, a cada três dias) por 33 dias. **A)** Média do número de tumores para cada grupo ao final do experimento. **B)** Multiplicidade tumoral (média da soma de todos os diâmetros por grupo ao final do experimento). **C)** Média do tamanho dos tumores por grupo no final do experimento. Valores representam média ± SEM de n= até 7, *p<0,05 diferença estatística com relação ao grupo veículo. *One-way* ANOVA seguido de teste Tukey.

Visto que a fração FAIII6-8 causou redução da expressão de genes pró-inflamatórios no modelo de carcinogênese AOM/DSS, uma ação principalmente no microambiente inflamatório do tumor poderia explicar a leve atividade no modelo espontâneo, porém não suficiente para inibir o desenvolvimento tumoral. No caso de CCR espontâneo, a inflamação atua em estágios mais avançados, sendo induzida pelo tumor em um processo chamado “*tumor elicited-inflammation*”, onde o próprio tumor pode recrutar células imunes

inflamatórias e superexpressar mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas gerando, portanto, uma inflamação causada pelo tumor (Grivennikov et al., 2010; Grivennikov et al., 2012; Grivennikov, 2013). Desta forma, o efeito da fração ativa não foi potente no modelo CCR espontâneo porque a inflamação é deflagrada pelo tumor já estabelecido. Este dado está de acordo com o resultado do esquema B de tratamento no modelo de AOM/DSS, que mostra que quando os tumores estão estabelecidos a fração não é capaz de inibir o desenvolvimento tumoral. Portanto a fração FAIII6-8 apresenta uma ação preventiva, que sobrepõe a ação terapêutica no contexto do câncer de cólon.

5. Conclusão

A progressão tumoral é dirigida por diversos fatores e vias, sendo muitos deles ligados ao microambiente inflamatório. Por isso, a atividade anti-inflamatória é uma importante característica buscada em novas drogas em potencial, sendo uma abordagem diferente no tratamento e prevenção do câncer. Nesse contexto, a fração FAIII6-8 obtida de *Croton campestris* preveniu o desenvolvimento de colite e de câncer associado à colite em modelos murinos através da modulação de citocinas pró-inflamatórias, reduzindo a formação de tumores. Embora o tratamento não tenha reduzido a multiplicidade dos tumores em modelo de CCR espontânea, a fração FAIII6-8 diminuiu o tamanho dos tumores, reforçando sua ação no processo inflamatório que promove a progressão tumoral. Tomado em conjunto, os dados obtidos reforçam principalmente a atividade anti-inflamatória da fração FAIII6-8 mostrando que a mesma apresenta ação preventiva mais importante a que terapêutica no contexto do câncer de cólon. Esses resultados não têm precedentes e representam um grande avanço na elucidação do mecanismo de ação dos componentes ativos de *Croton campestris*. Portanto, a fração FAIII6-8 mostrou-se como uma potencial fonte de novos componentes antitumorais e anti-inflamatórios no contexto do câncer colorretal.

CAPÍTULO 4

*Composição química do óleo essencial das folhas de Croton campestris A.St.-Hil
e atividade antiproliferativa*

CAPÍTULO 4

Resumo

Nesse estudo foi investigado o potencial antiproliferativo do óleo essencial obtido de folhas frescas de *Croton campestris* em células tumorais humanas oriundas de diferentes tecidos. Além disso, o óleo essencial obtido por hidrodestilação teve sua composição determinada por CG/EM. Foram identificados 10 componentes que compunham 91,59% da composição total do óleo tendo como componentes majoritários o cariofileno com 23,8% e o elemeno com 17,83%. A atividade citotóxica foi observada principalmente para as linhagens de tumor de mama (MCF-7) e cólon (HT-29), com GI₅₀ (concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular) de 8,61 e 9,94 µg/mL, respectivamente. Os resultados desse estudo mostraram que o óleo essencial obtido de *Croton campestris* A.St.-Hil. representa uma potencial fonte para a busca de novos agentes antitumorais.

1. Introdução

Por séculos, plantas e seus metabólitos secundários têm sido utilizados para o tratamento de diversas condições patológicas e, ainda hoje, em muitas regiões com pouco acesso à medicina moderna, os vegetais são a fonte primária para o tratamento caseiro de algumas doenças (Matic et al., 2016). À exemplo desses produtos secundariamente produzidos pelas plantas, os óleos essenciais (OE) são misturas terpênicas consideradas não fitotóxicas que ocorrem naturalmente e são isolados de diversas partes de vegetais através de hidrodestilação e outras técnicas (Shokri, 2016). Além dos terpenos, os principais grupos químicos constituintes dos metabólitos secundários são taninos, alcaloides e flavonoides, os quais têm sido explorados por suas propriedades farmacológicas (Kashani et al., 2012; Donati et al., 2015).

Na medicina popular o OE obtido de diversas plantas tem sido empiricamente usado como agente antifúngico, anti-inflamatório, bactericida, antitumoral, antiparasitário entre outras indicações (Carson et al., 2006; Donati et al., 2014; Shokri, 2016). No entanto, mesmo já em uso como terapia alternativa ou complementar, o mecanismo de ação e a composição permanecem desconhecidos para a grande maioria dos OE e, portanto, sua eficácia ainda carece de embasamento científico. Isto aponta para a importância de novos estudos de prospecção farmacológica, principalmente considerando a ampla pouco explorada biodiversidade brasileira.

Nesse contexto, o gênero *Croton* vêm sendo o foco de estudos quanto a propriedades farmacológicas e composição química, tanto de seus extratos foliares quanto de seus OE (Vunda et al., 2012; Motta et al., 2013; Turiel et al., 2013; de Souza Chagas et al., 2016). Uma das espécies mais estudadas desse gênero, a *Croton cajucara*, apresenta OE com diferentes propriedades farmacológicas como a ação antimicrobiana e leishmanicida atribuída especialmente ao mentol, eugenol e 7-hidroxi calameneno, a atividade antiproliferativa endereçada nos constituintes cipereno e α -copaeno (Rozza et al., 2011; Azevedo et al., 2013; Freires et al., 2015). Os óleos essenciais obtidos de outras espécies desse gênero também apresentaram atividade larvicida, antifúngica, amebicida e inseticida (Fontenelle et al., 2008; Vunda et al., 2012; Santos et al., 2014; Carvalho et al., 2016). Em 2013, Turiel e colaboradores identificaram 101 constituintes voláteis das espécies amazônicas *Croton draconoides*, *C. urucurana* e *Julocroton triqueter*. Nesse estudo, os OE das espécies eram constituídos principalmente por monoterpenos (1,2 – 40,2%), sesquiterpenos (34,0 – 49,6%) e sesquiterpenos oxigenados (11,5 – 51,3%).

Croton campestris A. St.-Hil., popularmente conhecida como “velame do campo”, é uma planta nativa do Brasil usada na medicina popular para ampla gama de doenças como

intoxicação, parasitoses, inflamação, gastrite entre outras (Babili et al., 2006; Salatino et al., 2007; Coutinho et al., 2011; Júnior et al., 2013). Com poucos estudos realizados sobre suas indicações de uso popular, apresenta apenas três referências versando sobre a caracterização química de seus componentes voláteis (Babili et al., 2009; Babili et al., 2012; Almeida et al., 2013). Babili e colaboradores em seus dois trabalhos (2009 e 2012) tiveram como material de partida as folhas secas ou as cascas das raízes de *C. campestris*. Em 2013, Almeida e colaboradores extraíram OE dos ramos e folhas frescas de *C. campestris* com avaliação de seu potencial antibiótico. No entanto, até o presente momento, nenhum estudo havia sido realizado sobre a avaliação da atividade antiproliferativa do OE de *Croton campestris* em cultura de células tumorais humanas.

Portanto, observando a atividade farmacológica de óleo essencial extraído de diversos representantes do gênero *Croton* e, visto que não há registros de avaliação farmacológica do OE obtido das folhas frescas do arbusto brasileiro *Croton campestris* A. St.-Hil., este trabalho teve como objetivo avaliar a composição e o potencial biológico de seus componentes voláteis.

2. Objetivo

Verificar a composição do óleo essencial das folhas frescas de *Croton campestris* A.St.-Hil., o rendimento do processo extrativo e sua propriedade antiproliferativa em cultura de células tumorais humanas.

3. Material e métodos

3.1. Material vegetal

As folhas de *Croton campestris* A.St.-Hil. foram coletadas no campo experimental do Centro de Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas no município de Paulínia-SP, Brasil (22°47'51,9"S 47°06'48,3"W). A exsicata referente à espécie apresenta número CPQBA16 e está depositada no mesmo local, e o acesso ao patrimônio genético foi autorizado pelo CGEN sob número processual 010358/2014-5.

3.2. Extração do óleo essencial (OE)

O OE das folhas frescas foi obtido em triplicata através de hidrodestilação em aparato de *Clevenger* após extração por 1,5 hora. Foram realizadas três extrações utilizando 92,43, 92,43 e 89,88 g de folhas frescas picadas e acondicionadas em balão contendo água destilada.

3.3. Análise por cromatografia gasosa acoplada a detector de espectro de massas (CG/EM)

O OE foi analisado por cromatografia gasosa acoplada a um detector seletivo de espectro de massas (CG/EM) usando o sistema HP-5890/5970 (Agilent Technologies, EUA) equipado com coluna de sílica J&W Scientific DB-5 (25 m x 0,2 mm x 0,33 µm). O programa 1 de temperatura foi 100°C (2°C/minuto) -180°C, o programa 2 foi 55°C (2°C/minuto) -80°C e o programa 3 foi 125°C (30°C/minuto)-150°C. Também foi usado injeto e detector de temperatura de 250°C e carregador de gás hélio. O espectro de massas foi captado a 70 eV com velocidade de varredura de 0,84 scan/s de 40 a 550 m/z. A identidade dos componentes foi confirmada tanto pelo espectro de massas e tempo de retenção, quanto pelos dados de condições idênticas de CG-EM. Os dados obtidos foram comparados aos de uma biblioteca (NIST) de espectros de massas do equipamento.

Para a análise dos resultados, foi utilizado o índice de retenção de Van den Dool e Kratz, onde:

$$IR = \frac{(t_s - t_{c_{n-1}}) \cdot 100}{(t_{c_n} - t_{c_{n-1}})} + 100c_{n-1}$$

t_s : tempo de retenção da substância analisada

t_{c_n} : tempo de retenção do n-alceno que elui após a substância analisada

$t_{c_{n-1}}$: tempo de retenção do n-alceno que elui antes a substância analisada

c_{n-1} : número de átomos de carbono do n-alceno que elui antes da substância analisada

A identificação dos componentes do óleo essencial de *C. campestris* foi obtida através da comparação entre o índice de retenção (IR) teórico e experimental (Adams, 2007).

3.4. Cultura de células tumorais humanas

Foram utilizadas 8 linhagens celulares, oriundas de tumores humanos: linhagens K562 (leucemia), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplas drogas), NCI-H460 (pulmão), HT29 (cólon), OVCAR-3 (ovário) e 786-0 (rim); e uma linhagem celular não tumoral HaCat (queratinócito humano). O estoque de células foi mantido em meio RPMI com 5% de SFB e penicilina-estreptomicina (2 mg/L) a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido.

3.5. Avaliação da atividade antiproliferativa

Em placas de 96 poços as células foram incubadas por 24 horas utilizando meio RPMI com 5% de SFB e penicilina-estreptomicina (2 mg/L) em densidades de inoculação de 4 a 7x10⁴ células/mL a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. O OE de *Croton campestris* foi aplicado nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL em triplicata por 48 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Após o tratamento o crescimento celular foi interrompido com a adição de 50µL de ácido tricloroacético (TCA) a 50% (Sigma[®]), e incubação por 1 hora a 4°C. Em seguida as placas foram submetidas a quatro lavagens consecutivas com água corrente para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Foram adicionados em cada compartimento 50 µL do corante proteico sulforrodamina B (SRB) (Sigma[®]) a 0,4 % dissolvido em ácido acético a 1 %, seguido de incubação a temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse período, as placas foram lavadas com solução de ácido acético 1% até a completa remoção dos resíduos de SRB. Após a completa

secagem das placas a temperatura ambiente, o corante ligado as proteínas foi solubilizado pela adição de 150 μL de Trizma Base na concentração 10 μM e pH 10,5 (Sigma[®]). Na sequência foi realizada a leitura espectrofotométrica de absorbância em leitor de microplacas a 540 nm (Molecular Devices[®], modelo VersaMax). A sulforrodamina B liga-se aos aminoácidos básicos das proteínas das células viáveis no momento da fixação e então, quanto maior a quantidade de SRB ligada ao compartimento, menor a atividade citotóxica da amostra em teste. De acordo com Monks e colaboradores (1991) e utilizando o *software* Origin[®], foi feita regressão sigmoide das curvas obtidas com as médias da porcentagem de crescimento e foram calculados os valores de GI_{50} (50% *of growth inhibition*) que são os valores da concentração necessária para inibir a proliferação celular em 50%.

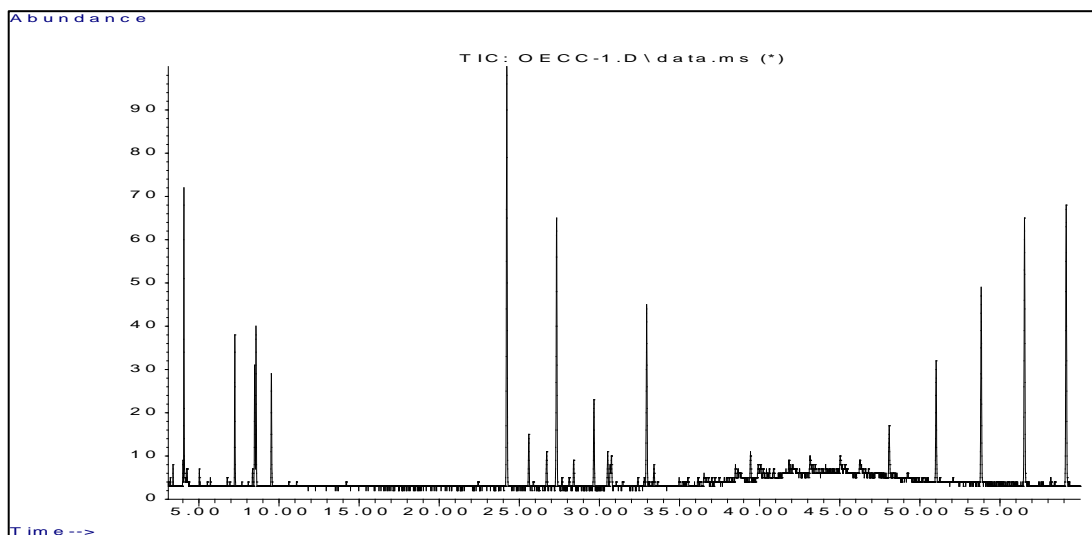
4. Resultados e discussão

A análise por CG/EM dos óleos essenciais (OE) é uma das técnicas analíticas mais difundidas atualmente para a análise de misturas voláteis. O rendimento médio das extrações do OE foi 0,28% e sua composição química foi analisada por CG/EM (Tab. 1). O baixo rendimento médio da extração do óleo essencial dificultou o aprofundamento dos estudos com esse material. No entanto, além de ser uma futura vertente nas pesquisas de nosso grupo, esses resultados inéditos sobre a atividade antiproliferativa desse material enriquecem o conhecimento sobre a ação anticâncer da espécie brasileira *Croton campestris* ainda pouco estudada.

Tabela 1. Rendimento da extração do OE de *Croton campestris* extraído por sistema *Clevenger* em triplicata.

	OECC-1	OECC-2	OECC-3	Média
Massa inicial (g)	92,43	92,43	89,88	91,58±1,47
Massa de óleo obtida (g)	0,26	0,24	0,26	0,25±0,01
Rendimento em massa (% m/m)	0,28%	0,26%	0,29%	0,28±0,00

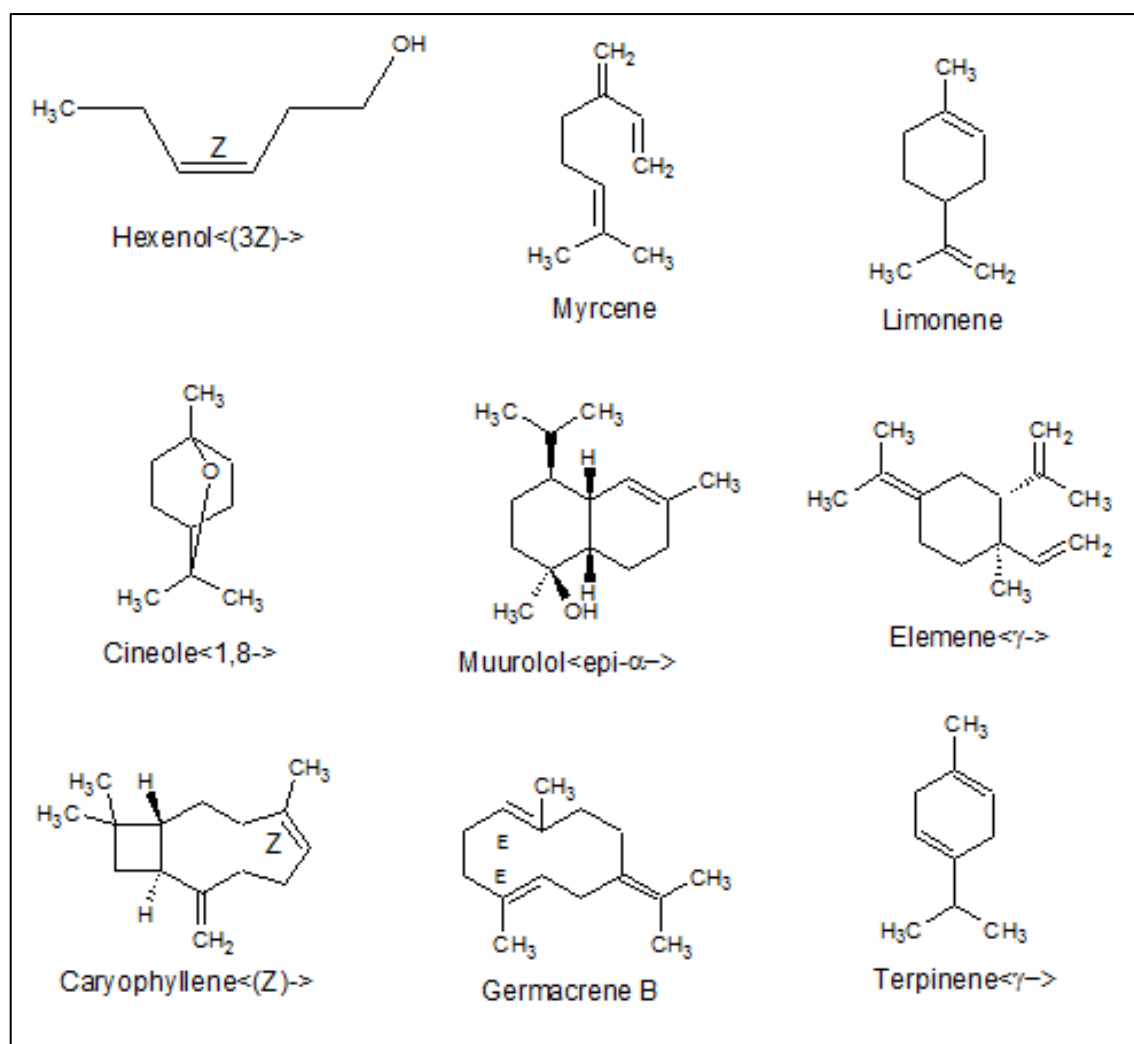
Figura 1. Perfil do OE de *Croton campestris* obtido por cromatografia a gás usando o sistema HP-5890/5970 (Agilent Technologies, EUA).



Neste estudo foram identificados compostos por comparação de seus índices de retenção e espectros de massas com os da literatura (Adams, 2007). À avaliação destes parâmetros se fez necessária para não incorrer em interpretações equivocadas dos dados analisados. A biblioteca de espectros de massas instalada no equipamento CG/EM forneceu

informação sobre o tipo de esqueleto carbônico dos componentes presentes no óleo. No entanto, a identificação somente pela fragmentação observada é insuficiente para a caracterização dos diversos componentes encontrados no OE, pois o padrão de fragmentação de vários sesquiterpenos é similar e sem diferenças significativas nas suas abundâncias relativas. O uso de índices de retenção associados à comparação de espectros de massas tem sido muito eficiente na elucidação dos componentes de OE. As fórmulas estruturais dos principais compostos identificados estão ilustradas na figura 2.

Figura 2. Fórmulas estruturais dos principais compostos identificados nas amostras de OE de *Croton campestris*.



Mesmo apresentando variações com os índices de retenção da literatura estes valores são muito úteis. Os valores experimentais observados podem ser corrigidos, pois a sequência de eluição se mantém constante independente da temperatura em que são efetuadas as determinações. Como existem várias referências que citam diversos terpenos com seus

respectivos índices de retenção fica fácil extrapolar estes dados para o valor experimental obtido, tendo assim uma sugestão de identificação do composto. Isso pôde ser conferido pela co-injeção com um padrão autêntico.

Tabela 2. Composição química do OE de *Croton campestris* extraído por sistema Clevenger em triplicata e analisado por CG/EM.

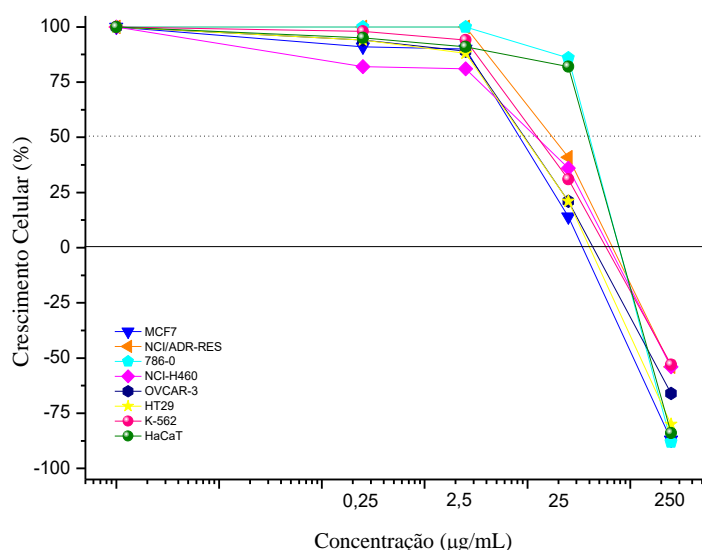
Composto	OECC-1	OECC-2	OECC-3	IR		Composição média (% m/m) \pm DP
				Teórico	Experimental	
Cariofileno<(Z)->	22,966	22,418	26,151	1408	1409	23,8 \pm 1,2
Elemeno< γ ->	15,334	15,060	17,833	1434	1449	16,08 \pm 0,88
Murolol<epi- α ->	10,194	9,605	9,436	1640	1642	9,74 \pm 0,23
Hexenol<(3Z)->	8,282	8,463	8,902	850	853	8,54 \pm 0,18
Cineol<1,8->	6,454	7,413	8,059	1026	1031	7,31 \pm 0,47
Mirceno	5,298	7,064	7,133	988	991	6,50 \pm 0,60
Limoneno	5,017	6,533	6,712	1024	1028	6,09 \pm 0,54
Terpineno< γ ->	4,887	6,151	6,036	1054	1058	5,69 \pm 0,40
Germacreno B	4,922	4,881	5,167	1559	1555	4,990 \pm 0,089
Humuleno< α ->	2,836	2,727	2,835	1452	1427	2,83550 \pm 0,00029
Outros	13,81	9,685	1,736	-	-	8,41 \pm 6,14

De acordo com a avaliação da composição do OE extraído das folhas frescas de *Croton campestris*, foram observadas 10 substâncias que compunham 91,59% da massa total do OE. Dentre eles, os principais componentes identificados por CG/EM para o OE de *Croton campestris* foram o cariofileno com 23,8% da composição total e o elemeno com 16,08% (Tab. 2). Em estudo prévio, sem descrição da parte utilizada da planta, foi reportado a presença de 1-metil-2-(1 metil etil) benzeno, 1,8-cineol, cânfora, γ -terpineol, L-limoneno e γ -pineno como os cinco componentes majoritários do óleo essencial de *C. campestris* (Lima et al., 1993). Babili e colaboradores (2009) demonstraram como principais componentes do OE extraído das folhas secas de *C. campestris* o óxido de cariofileno (29,9%), óxido de humuleno (8,0%) e germacreno (6,0%). Já em estudo posterior, o mesmo grupo apresentou como componentes majoritários do OE extraído das cascas das raízes de *C. campestris* o espatulenol com 23,3% e borneol com 18,7% (Babili et al., 2012). Almeida e colaboradores (2013) no OE obtido a partir das folhas frescas de *C. campestris* foram descritos como componentes majoritários o β -cariofileno (17,0%) e o biclorgemacreno (16,2%). Dessa forma, as diferenças na constituição do OE estão sujeitas a diversos fatores, entre eles a variabilidade da composição circadiana, dependendo da área e da intensidade de radiação solar recebida pela planta, horário de coleta do material

vegetal, e a parte do vegetal utilizada na extração (Brant *et al*, 2009; Dai *et al*, 2014; Donati *et al*, 2015).

Na avaliação da atividade antiproliferativa, as principais linhagens celulares afetadas pelo tratamento com o OE foram as linhagens de tumor de mama, cólon, ovário e pulmão com GI₅₀ de 8,61, 9,94, 10,34 e 11,51 µg/mL, respectivamente (Tab. 3). Podemos observar também que houve atividade mais potente a partir da concentração de 25 µg/mL com atividade citocida na maior concentração utilizada (Fig. 3).

Figura 3. Atividade antiproliferativa do OE de *Croton campestris* após 48 horas de exposição à amostra.



Linhagens: MCF-7 (mama), NCI/ADR-RES (ovário resistente à múltiplas drogas), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão tipo células não pequenas), OVCAR-3 (ovário), HT29 (cólon), K-562 (leucemia), HaCaT (queratinócito humano normal).

Diferente do que ocorre com amostras obtidas das frações e extrato bruto, o perfil de atividade antiproliferativa apresentado pelo OE não demonstrou a seletividade para tumor de pulmão e rim, NCI-H460 e 786-0 respectivamente. Isso indica que as substâncias ativas do OE podem atuar por mecanismos diferentes daqueles envolvidos na ação citotóxica reportada em estudos prévios (Monteiro 2012; Monteiro *et al.*, 2014).

Tabela 3. Valores de GI₅₀ (µg/mL) do óleo essencial de *Croton campestris*.

	MCF-7	NCI/ADR-RES	786-0	NCI-H460	OVCAR-3	HT29	K-562	HaCaT
OE	8,61	24,82	30,85	11,51	10,34	9,94	22,35	29,90

Não há registros na literatura sobre a atividade antiproliferativa em células tumorais humanas do OE obtido de *C. campestris*. No entanto, alguns estudos relatam a atividade biológica sobre microrganismos, o que corrobora o efeito farmacológico desse material. Dados obtidos por Babili e colaboradores (2009) mostraram a efetividade do OE de *C. campestris* sobre *S. aureus*, *Enterococcus hirae* e *Candida albicans*. Almeida e colaboradores (2013) também demonstraram a atividade antibacteriana sobre *S. aureus* e *E. coli*. Dessa maneira, a atividade citotóxica previamente descrita para microrganismos corrobora o potencial antiproliferativo do OE de *C. campestris* sobre para células tumorais humanas relatada, pela primeira vez, neste estudo.

Substâncias comumente presentes em OE, Z-cariofileno, E-cariofileno e β -cariofileno foram alvo de diversos estudos de atividade citotóxica. Diversos estudos relataram a atividade pró-apoptótica do β -cariofileno em células tumorais (Amiel et al., 2012; Dahham et al., 2015). Além disso, pesquisadores recentemente demonstraram sua atividade antitumoral e antimetastática em modelo murino de melanoma (Jung et al., 2015). Já o elemeno corresponde à 16% da composição do OE de *C. campestris* sendo o segundo componente mais abundante. De estrutura similar, o β -elemeno sintético ou obtido de óleo essencial de diferentes espécies vegetais, tem sido reportado com atividade antitumoral sobre células tumorais foliculares da tireoide, células tumorais cerebrais e células de carcinoma esofágico (Li et al., 2013; Hu et al., 2014; Zhou et al., 2016). Um dos mecanismos de ação relacionados à atividade antiproliferativa do elemeno pode estar relacionado à parada do ciclo celular na fase G0/G1 e consequente inibição da proliferação dessas células o que corrobora a atividade citostática observada no ensaio antiproliferativo (Yao et al., 2008). Esses dados reforçam a importância de estudos mais amplos a fim de elucidar os mecanismos celulares envolvidos na atividade antiproliferativa do OE de *Croton campestris*.

5. Conclusão

O óleo essencial obtido de folhas frescas de *Croton campestris* apresentou cariofileno e elemeno como elementos majoritários, mostrando um padrão de composição química diferente do OE obtido de outras partes da planta. Além disso, corroborando o conhecimento e uso popular, o OE obtido de *Croton campestris* apresentou potencial antiproliferativo em linhagens tumorais humanas, atividade descrita, pela primeira vez, neste trabalho. Portanto, os resultados aqui reportados reforçam a importância do aprofundamento nas pesquisas sobre aspectos fitoquímicos, toxicológicos e farmacológicos de produto obtidos de *Croton campestris* A.St.-Hil..

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O ambiente inflamatório caracteriza um ambiente propício ao desenvolvimento dos tumores, por isso tem sido um importante alvo na busca por novos agentes anticâncer. Assim, agentes que possuam ações anti-inflamatórias e antiproliferativas se tornam potenciais a serem inseridos na prevenção e tratamento do câncer. Considerando a vasta biodiversidade brasileira e o pouco conhecimento sobre as atividades biológicas de diversas espécies, o presente estudo, que teve caráter multidisciplinar, gerou novos resultados sobre as propriedades farmacológicas da espécie brasileira *Croton campestris* A.St.-Hil., fazendo uma conexão entre as atividades antitumorais e anti-inflamatórias observadas e apontando essa espécie como uma importante fonte de compostos a serem utilizados na prevenção do câncer.

Nesse contexto, através de diferentes experimentos foi possível verificar a atividade anti-inflamatória de frações ativas de semelhante perfil fitoquímico, além da inédita atividade antiproliferativa observada para o óleo essencial de *C. campestris*. Assim, a diminuição do edema de pata, do edema de orelha, da migração leucocitária para o peritônio em modelo de peritonite e da colite aguda comprovam a ação dessas frações. Os dados em conjunto mostram a atuação das frações em diferentes etapas do processo inflamatório. No edema de pata a inibição da fase inicial da inflamação, a fase humoral, é coerente com a diminuição da expressão de mediadores inflamatórios como COX-2, que atua na síntese de prostaglandinas, um dos fatores que levam ao edema nessa fase (Posadas et al., 2004). O resultado positivo sobre o edema de orelha também corrobora a atividade observada. A inibição da migração de leucócitos no modelo de peritonite induzida por carragenina e a diminuição na concentração de MPO tanto nesse modelo quanto no experimento de edema de orelha, correlacionam-se fortemente com os dados moleculares obtidos a partir do modelo de colite aguda. Nele foi possível observar a diminuição da expressão de citocinas-chave no recrutamento de células inflamatórias, como IL-6 e IL-23. A proteína IL-6 também foi reduzida em experimento *in vitro* através do tratamento prévio com a fração utilizando macrófagos estimulados por LPS. Além disso, os dados de expressão relativa de diversos mediadores inflamatórios no experimento de colite, tomados em conjunto, apontam para inibição da resposta inflamatória do tipo TH17 com a inibição do eixo IL-23/IL-17/IL-22.

Sobre a relação câncer-inflamação, os dados de atividade anti-inflamatória, correlacionados ao resultado positivo frente à inibição do crescimento tumoral no modelo de tumor de pata de Ehrlich, também reforçam a correlação entre a atividade anticâncer e anti-inflamatória, já que a inibição de mediadores inflamatórios favorece a atividade antiproliferativa e o desenvolvimento tumoral (Vendramini-Costa & Carvalho, 2012).

Assim, em modelo de carcinogênese de cólon induzido por azoximetano e promovido por processo inflamatório estimulado por DSS, pôde-se estudar diretamente a relação entre a geração de um ambiente inflamado e a formação de tumores. O tratamento prévio com a fração FAIII6-8 reduziu tanto o número quanto o tamanho dos tumores, enquanto para o tratamento feito após o estabelecimento da inflamação, isto é, após os ciclos de DSS, não houve diferença em ambos número e tamanho dos tumores quando comparados os grupos tratados e o grupo controle. Além disso, em modelo de câncer de cólon espontâneo, onde não há a inflamação como fator de promoção tumoral, o efeito observado com o tratamento foi mínimo. Então, uma ação principalmente no microambiente inflamatório do tumor poderia explicar a leve atividade nesse modelo. Além disso, pelos resultados apresentados, a fração FAIII6-8 apresenta uma ação preventiva que sobrepõe a terapêutica no experimento realizado. Além disso, esse resultado reforça a atividade anti-inflamatória também para modelos no contexto do câncer de cólon.

Nos estudos focando na linhagem tumoral de pulmão os dados são coerentes com os observados tanto para atividade antitumoral quanto para a atividade anti-inflamatória. No tratamento das células NCI-H460 com a fração FAIII6-8 pudemos observar a diminuição da forma ativa de NF- κ B, que é um elemento-chave na regulação de diversas vias relacionadas à imunidade inata e adaptativa, resposta ao estresse, inflamação, proliferação celular, entre outras (Tornatore et al., 2012; Gilmore, 2014; Mitchell et al., 2016). Esse dado é coerente com o observado para o experimento de colite, quando o tratamento causou a diminuição da expressão de IL-1 α e IL-1 β , que estão diretamente ligadas à ativação de NF- κ B.

Com relação ao tipo de morte celular, os dados apontam para geração de estresse oxidativo celular e ativação de vias de morte por necroptose. Os dados apresentados mostram aumento de ROS, ânions superóxido e perda do potencial de membrana mitocondrial, fatores que podem ser determinantes no destino da célula tumoral. Isso porque o nível basal de ROS nessas células já é mais alto. Além disso, os mecanismos antioxidantes estão em geral inibidos ou corrompidos em células tumorais, sendo assim, esse efeito sugere que aumentar mais ainda a concentração desses radicais leva a exaustão do mecanismo compensatório das células tumorais, levando à ativação de vias de morte celular e, conseqüentemente, limitando a progressão tumoral (Diehn et al., 2009; Raj et al., 2011; Galadari et al., 2017). Outro fator que corrobora para o efeito observado pelo tratamento com a fração FAIII6-8 foi o aumento da expressão de p-JNK, uma vez que essa quinase também pode potencializar necroptose através do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio estimulada por TNF. Reforçando

esse dado, os níveis de TRAF2 e NF- κ B não foram modificados após o tratamento, sugerindo que não há a formação do complexo I, estando a RIP1 livre para a formação do complexo IIb ou necrossomo, já que TRAF2 inibe a formação deste complexo.

Nesse contexto, o aumento na produção desses radicais no início do tratamento pode levar ao aumento de RIP1, como foi observado nas células tratadas, o qual está envolvido na morte necroptótica. Além disso, foi também observada a morte celular sem externalização de fosfatidilserina ou ativação de caspases, dados esses que reforçam a hipótese de ocorrência de necroptose e não apoptose.

Portanto, em conjunto, os dados revelam que o tratamento das células NCI-H460 causou aumento de ROS, o que leva à ativação de JNK, com inibição de NF- κ B e aumento de RIP, que em conjunto caracterizam a necroptose. Num cenário onde a evasão dos processos de morte por apoptose é uma característica marcante das células malignas e fundamental para a progressão tumoral, a indução de um tipo alternativo de morte celular pode ser importante para a contenção do desenvolvimento tumoral (Meylan & Tschopp, 2005; Hanahan & Weinberg, 2011; Melo-Lima et al., 2014).

Com relação à constituição das frações ativas, o componente majoritário apontado foi o ácido gálico, pela primeira vez descrito em *Croton campestris* A.St.-Hil. Apesar de apresentar relatos na literatura sobre suas atividades biológicas, os estudos avaliando sua ação farmacológica *in vivo* são escassos e seu mecanismo de ação ainda não está completamente claro, especialmente em células NCI-H460, nas quais não há relatos de avaliação de sua atividade.

Dessa maneira, os dados apresentados nos diferentes capítulos desse trabalho se interconectam, apresentando a espécie *Croton campestris* A.St.-Hil como uma fonte de novas substâncias antitumorais e, especialmente, anti-inflamatórias. Vale ressaltar que estudos adicionais avaliando estratégias para a purificação de suas frações bem como o aprofundamento na averiguação de sua toxicidade *in vivo* são necessários.

CONCLUSÕES GERAIS

- O método escolhido para obtenção de frações ativas foi a purificação do extrato bruto por acetato de etila por partição líquido-líquido e fracionamento em coluna cromatográfica utilizando sílica *flash* uma vez que as frações ativas apresentam forte interação com a fase estacionária.

- As frações FAI25-31ACN e FAIII6-8 apresentaram componentes já descritos para o gênero *Croton*, sendo seu componente majoritário o ácido gálico, dado esse, descrito pela primeira vez para a espécie.

- As frações ativas mostraram atividade citostática e seletividade para linhagem de tumor de pulmão humano NCI-H460.

- As frações ativas apresentaram atividade antitumoral em modelo de tumor sólido de Ehrlich e atividade anti-inflamatória em modelos de edema de orelha e edema de pata, com diminuição da primeira fase da inflamação e redução da migração de leucócitos. Também foi observada a redução da migração leucocitária em modelo de peritonite em animais tratados.

- Nas primeiras horas de tratamento, a fração FAIII6-8 aplicadas em células NCI-H460 levou à morte celular caracterizada pela geração de estresse oxidativo, perda do potencial de membrana mitocondrial, ausência de externalização de fosfatidilserina e sem envolvimento de caspases, concomitante ao aumento da expressão de RIP, o que sugere a ocorrência de necroptose. Em tempos maiores, o estresse oxidativo é compensado e há diminuição dos níveis de RIP, havendo morte por necrose não regulada.

- A fração FAIII6-8 diminuiu a severidade da colite em modelo *in vivo* além de reduzir o número e tamanho de tumores em modelo de câncer colorretal associado à colite. Tomado em conjunto, os dados obtidos reforçam principalmente a atividade anti-inflamatória da fração FAIII6-8, mostrando que a mesma apresenta ação preventiva mais importante que a terapêutica no contexto do câncer de cólon.

- O óleo essencial obtido de *Croton campestris* é rico principalmente em cariofileno, elemeno e murolol, e apresentou atividade antiproliferativa em diversas linhagens tumorais humanas.

CONCLUSÃO

A espécie brasileira *Croton campestris* A.St.-Hil. mostrou-se potente e promissora fonte de novos agentes antitumorais e anti-inflamatórios, sendo especialmente importante na prevenção do processo inflamatório relacionado à carcinogênese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- Adams RP. (2007) Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry 4th edition. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 803.
- Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. (2006) Inflammation and cancer: How hot is the link? *Biochemical Pharmacology* 72:1605–1621.
- Aggarwal BB, Vijayalekshmi RV, Sung B (2009) Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clin Cancer Res* 15(2):425–430
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2010) *Biologia Molecular da célula*. 5ª edição, Artmed, Porto Alegre, X p.
- Albishi T, John JA, Al-Khalifa AS, Shahidi F. (2013) Antioxidant, antiinflammatory and DNA scission inhibitory activities of phenolic compounds in selected onion and potato varieties. *J. Funct. Foods* 5, 930–939.
- Almeida TS, Rocha JBT, Rodrigues FFG, Campo AR, Costa JGM. (2013) Chemical composition, antibacterial and antibiotic modulatory effect of *Croton campestris* essential oils. *Industrial Crops and Products*, 44: 630– 633.
- Amiel E, Ofir V, Dudai N, Soloway E, Rabinsky T, Rachmilevitch S. (2012) β -Caryophyllene, a Compound Isolated from the Biblical Balm of Gilead (*Commiphora gileadensis*), Is a Selective Apoptosis Inducer for Tumor Cell Lines. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 8p.
- Antoniou E, Margonis GA, Angelou A, Zografos GC, Pikoulis E. (2015) Cytokine Networks in Animal Models of Colitis-associated Cancer. *Anticancer research*, 35:19-24.
- Araujo MAR. (2012) Hepatotoxicidade associada à nimesulida: uma revisão da literatura. *Rev. Bras. Farm.* 93(3): 283-289.
- ATCC – The Global Bioresource Center. Disponível em: <https://www.atcc.org/>. Acesso em 03/01/2017.
- Atwal M, Lishman EL, Austin A, Cowell IG. (2017) Myeloperoxidase Enhances Etoposide and Mitoxantrone-Mediated DNA Damage: A Target for Myeloprotection in Cancer Chemotherapy. *Molecular Pharmacology*, 91(1): 49-57.
- Azevedo A, Cunha V, Teixeira AL, Medeiros R. (2011) IL-6/IL-6R as a potential key signaling pathway in prostate cancer development. *World J Clin Oncol*, 2(12):384–396.

- Azevedo MM, Chaves FC, Almeida CA, Bizzo HR, Duarte RS, Campos-Takaki GM, Alviano CS, Alviano DS. (2013) Antioxidant and antimicrobial activities of 7-hydroxycalamenene rich essential oils from *Croton cajucara* Benth. *Molecules*, 18(1):1128-37. doi: 10.3390/molecules18011128.
- Babili FE, Moulis C, Bon M, Respaud MJ, Fourasté I. (1998) Three furanoditerpenes from the bark of *Croton campestris*. *Phytochemistry*, vol 48 (1): 165-169.
- Babili FE, Fabre N, Moulis C, Fouraste I. (2006) Molluscicidal activity against *Bulinus truncatus* of *Croton campestris*. *Fitoterapia*, 77(5):384-7.
- Babili FE, Fouraste I, Moulis C, Bessiere JM, Roques C, Haddioui L. (2009) Essential Oil of Leaves of *Croton campestris* St. Hilaire, Its Secretory Elements, and Its Biological Activity. *Journal of Essential Oil Research*, 21(3):272-275.
- Babili FE, Roques C, Haddioui L, Bellvert F, Bertrand C, Chatelain C. (2012) Velamo do campo: its volatile constituents, secretory elements, and biological activity. *J Med Food*, 15(7):671-6.
- Balkwill F, Mantovani A. (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, 357:539-45.
- Balunas MJ & Kinghorn AD. (2005) Drug Discovery from Medicinal Plants. *Life Sciences*, 78: 431-441.
- Barker N, Ridgway RA, van Es JH, van de Wetering M, Begthel H, van den Born M. (2009) Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* 457:608–611.
- Baud V, Karin M. (2001) Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol.* 11:372–377.
- BenSaad LA, Kim KH, Quah CC, Kim WR, Shahimi M. (2017) Anti-inflammatory potential of ellagic acid, gallic acid and punicalagin A&B isolated from *Punica granatum*. *BMC Complement Altern Med.*, 17(1):47.
- Berasaina C & Avila MA. (2014) Amphiregulin. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 28:31–41.
- Berghe VT, Kaiser WJ, Bertrand MJ, Vandenabeele P. (2015) Molecular crosstalk between apoptosis, necroptosis, and survival signaling. *Mol Cell Oncol*, 2(4):e975093.
- Bertram JS & Janik P. (1980) Establishment of a cloned line of Lewis Lung Carcinoma cells adapted to cell culture. *Cancer Lett.* 11(1): 63-73.
- Bessone F. (2010) Non-steroidal anti-inflammatory drugs: What is the actual risk of liver damage?. *World J Gastroenterol*, 16(45): 5651-5661.

Bigner DD, Bigner SH, Pontén J, Westermark B, Mahaley MS, Ruoslahti E, Herschman H, Eng LF, Wikstrand CJ. (1981) Heterogeneity of Genotypic and phenotypic characteristics of fifteen permanent cell lines derived from human gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 40(3):201-229.

Bissell MJ & Hines WC. (2011) “Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat Med*, 17(3):320-9.

Blake SJ & Teng MWL. (2014) Role of IL-17 and IL-22 in autoimmunity and cancer. *Actas Dermosifiliogr*, 105(1):41–50.

Bonomi M, Patsias A, Posner M, Sikora A. (2014) The role of inflammation in head and neck cancer. *Adv Exp Med Biol*. 816:107-27.

Borghi A, Verstrepen L, Beyaert R. (2016) TRAF2 multitasking in TNF receptor-induced signaling to NF- κ B, MAP kinases and cell death. *Biochem Pharmacol*. 116:1-10.

Boshtam M, Asgary S, Kouhpayeh S, Shariati L, Khanahmad L. (2017) Aptamers Against Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines: A Review. *Inflammation*. 40(1): 340–349.

Boyapati RK, Rossi AG, Satsangi J, Ho GT. (2016) Gut mucosal DAMPs in IBD: from mechanisms to therapeutic implications. *Mucosal Immunol*, 9(3):567-82.

Bradley PP, Christensen RD, Rothstein G. (1982) Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. *Blood*, 60: 618–622.

Bradley JR, Pober JS. (2001) Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene* 20:6482–6491.

Brandão MG, Zanetti NN, Oliveira P, Graef CF, Santos AC, Monte-Mór RL. (2008) Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the official Pharmacopoeia. *Journal of Ethnopharmacology*, 120, 141-148.

Brandão HN. (2010) Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *Quim Nova*, 33(6): 1359-1369.

Brant RS, Pinto JE, Rosa LF, Albuquerque CJB, Ferri PH, Corrêa RM. (2009) Crescimento, teor e composição do óleo essencial de melissa cultivada sob malhas fotoconversoras. *Cienc. Rural*, 39(5):1401-1407.

Brito Júnior FE, Oliveira DO, Bento EB, Leite LHI, Souza DO, Siebra ALA, Sampaio RS, Martins AOPB, Ramos AGB, Tintino SR, Lacerda-Neto LJ, Figueiredo PL, Oliveira LR, Rodrigues CKS, Sales VS, Figueiredo FRSDN, Nascimento EP, Monteiro AB, Amaro EN, Costa JGM, Coutinho HDM, Menezes IRA, Kerntopf MR. (2013)

Antiulcerogenic activity of the hydroalcoholic extract of leaves of *Croton campestris* A.St.-Hil. in rodents. Evidence-Based Complement. Altern. Med., 2013: 01–10.

Brito Junior FE, de Oliveira DR, Boligon AA, Athayde ML, Kamdem JP, Macedo GE, da Silva GF, de Menezes IR, Costa JG, Coutinho HD, Kerntopf MR, Posser T. (2014) Protective effects of *Croton campestris* A.St.-Hil. in different ulcer models in rodents: evidence for the involvement of nitric oxide and prostaglandins. J Ethnopharmacol, 153(2):469-77.

Brito Júnior FE, Macedo GE, Zemolin AP, da Silva GF, Cruz LC, Boligon AA, de Menezes IRA, Franco JL, Posser T. (2016) Oxidant effects and toxicity of *Croton campestris* in *Drosophila melanogaster*. Pharmaceutical Biology, 54(12):3068-3077.

Calixto-Campos C, Zarpelon AC, Corrêa M, Cardoso RD, Pinho-Ribeiro FA, Cecchini R, Moreira EG, Crespigio J, Bernardy CC, Casagrande R, Verri WA Jr. (2013) The Ehrlich tumor induces pain-like behavior in mice: a novel model of cancer pain for pathophysiological studies and pharmacological screening. Biomed Res Int. ID 624815, 12 p.

Carson CF, Hammer KA, Riley TV. (2006) *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. Clin Microbiol Rev, 19: 50–62.

Carvalho KD, E Silva SL, de Souza IA, Gualberto SA, da Cruz RC, Dos Santos FR, de Carvalho MG. (2016) Toxicological evaluation of essential oil from the leaves of *Croton tetradenius* (Euphorbiaceae) on *Aedes aegypti* and *Mus musculus*. Parasitol Res, 115(9):3441-8.

Chabner BA & Roberts Jr TG. (2005) Chemotherapy and the war on cancer. Nat. Rev., 5: 65.

Chang CH, Jonathan DC, Leonard BM et al. (2013) Posttranscriptional Control of T Cell Effector Function by Aerobic Glycolysis. Cell. 153(6): 1239–1251.

Chang YJ, Hsu SL, Liu YT, Lin YH, Lin MH, Huang SJ, et al. (2015) Gallic Acid Induces Necroptosis via TNF- α Signaling Pathway in Activated Hepatic Stellate Cells. PLoS ONE 10(3):e01200713.

Chen W, Li Z, Bai L, Lin Y. (2011) NF-kappaB in lung cancer, a carcinogenesis mediator and a prevention and therapy target. J Virtual Libr 16:1172–1185.

Chen YJ, Chang LS, (2012) Gallic acid downregulates matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in human leukemia cells with expressed Bcr/Abl. Mol. Nutr. Food Res. 56, 1398–1412.

Chen D, Yu J, Zhang L. (2016) Necroptosis: an alternative cell death program defending against cancer. Biochim Biophys Acta 1865(2):228-36.

Cheuka PM, Mayoka G, Mutai P, Chibale K. (2016) The Role of Natural Products in Drug Discovery and Development against Neglected Tropical Diseases. *Molecules*, 22(1). pii: E58. doi: 10.3390/molecules22010058

Cheung KL, Khor TO, Huang MT, Kong AN. (2010) Differential *in vivo* mechanism of chemoprevention of tumor formation in azoxymethane/dextran sodium sulfate mice by PEITC and DBM. *Carcinogenesis*, 31(5):880-885.

Chinnam M & Goodrich DW. (2011) RB1, development, and cancer *Curr Top Dev Biol*. 94: 129–169.

Choubey S, Varughese LR, Kumar V, Beniwal V. (2015) Medicinal importance of gallic acid and its ester derivatives: a patent review. *Pharm Pat Anal*. 4(4):305-15.

Christofferson DE & Yuan J. (2010) Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Curr Opin Cell Biol*. 22(2):263-8.

Ciesla L & Moaddel R. (2016) Comparison of analytical techniques for the identification of bioactive compounds from natural products. *Nat Prod Rep*. 33(10):1131-45.

Coffey ET. (2014) Nuclear and cytosolic JNK signalling in neurons. *Nature Reviews Neuroscience*. 15:285–299.

Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. (2009) Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*, 30:1073-81.

Cooper S, Spiro SG. (2006) Small cell lung cancer: treatment review. *Respirology*. 11(3):241-8.

Coppoc GL. (1992) Quimioterapia das doenças neoplásicas. In: Booth NH, McDonald LE. *Farmacologia e terapêutica veterinária*. 6ªed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 687-670.

Cordeiro I, Secco R, Carneiro-Torres DS, Lima LR, Caruzo MBR, Berry P, Riina RG. (2010) Croton in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB017507>. [Acesso em 18 de janeiro de 2017].

Coutinho HD, Matias EF, Santos KK, Santos FA, Morais-Braga MF, Souza TM, Andrade JC, Souza CE, Tintino SR, Guedes GM, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP, Costa JG. (2011) Modulation of the norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* by *Croton campestris* A. and *Ocimum gratissimum* L. *Biomedica*, 31(4):608-12.

- Cragg GM & Newman DJ. (2009) Nature: a vital source of leads for anticancer drug development. *Phytochem Rev*, 8: 313–331
- Cragg GM & Newman DJ. (2013) Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta.*, 1830(6):3670-95
- Cragg GM, Grothaus PG, Newman DJ. (2014) New horizons for old drugs and drug leads. *J Nat Prod.*, 77:703-723.
- Croce CM & Reed JC. (2016) Finally, An Apoptosis-Targeting Therapeutic for Cancer. *Cancer Res*; 76(20).
- Cua, DJ & Tato CM. (2010) Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nature Reviews Immunology*, v. 10, p. 479-489.
- Cukovic CS, Vucelić B, Urek MC. (2013) The role of anti-TNF therapy in ulcerative colitis. *Acta Med Croatica*. 67(2):171-7.
- Cunha LC, Azeredo FS, Mendonça ACV, Vieira MS, Pucci LL, Valadares MC, Freitas EOG, Sena AAS, Junior RSL. (2009) Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(2): 403-411.
- Cuzick J, Otto F, Baron JA, Brown PH, Burn J, Greenwald P, Jankowski J, La Vecchia C, Meyskens F, Senn HJ, Thun M. (2009) Aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: an international consensus statement. *Lancet Oncol* 10(5):501–507.
- Dahham SS, Tabana YM, Iqbal MA, Ahamed MBK, Ezzat MO, Majid ASA, Majid AMSA. (2015) The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Sesquiterpene β -Caryophyllene from the Essential Oil of *Aquilaria crassna*. *Molecules*, 20:11808-11829.
- Dai N, Thang TD, Ogunwande IA. (2014) Chemical composition of essential oils from the leaves and stem barks of Vietnamese species of *Polyalthia harmandii*, *Polyalthia jucunda* and *Polyalthia thorelii*. *Nat Prod Res*, 28(8):555-62.
- Davies C, Tournier C. (2012). Exploring the function of the JNK (c-Jun N-terminal kinase) signalling pathway in physiological and pathological processes to design novel therapeutic strategies. *Biochemical Society Transactions*. 40(1)85-89.
- Davis RJ. (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103:239–252.

- Demiroglu-Zergeroglu A, Candemir G, Turhanlar E, Sagir F, Ayvali N. (2016) EGFR-dependent signalling reduced and p38 dependent apoptosis required by Gallic acid in Malignant Mesothelioma cells *Biomedicine & Pharmacotherapy* 84:2000-2007.
- Dhanasekaran DN & Reddy EP. (2008) JNK Signaling in Apoptosis. *Oncogene*. 27(48): 6245–6251.
- Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, Qian D, Lam JS, Ailles LE, Wong M, Joshua B, Kaplan MJ, Wapnir I, Dirbas FM, Somlo G, Garberoglio C, Paz B, Shen J, Lau SK, Quake SR, Brown JM, Weissman IL, Clarke MF. (2009) Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature*. 458(7239):780-3.
- Donati M, Mondin A, Chen Z, Miranda FM, do Nascimento BB Jr, Schirato G, Pastore P, Frolidi G. (2015) Radical scavenging and antimicrobial activities of *Croton zehntneri*, *Pterodon emarginatus* and *Schinopsis brasiliensis* essential oils and their major constituents: estragole, trans-anethole, β -caryophyllene and myrcene. *Nat Prod Res*, 29 (10):939-46.
- Dondelinger Y, Darding M, Bertrand MJB, Walczak H. (2016) Poly-ubiquitination in TNFR1-mediated necroptosis. *Cell. Mol. Life Sci*. 73:2165–2176.
- Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y. (1997) Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res*. 57(10):1835-40.
- Ehrlich, P. (1906) Experimentally carcinomastudien an Mäusen. *Arb Inst Exp Ther Frankfurt*, 1:78-80.
- Ekambaram SP, Perumal SS, Pavada S. (2017) Anti-inflammatory effect of *Naravelia zeylanica* DC via suppression of inflammatory mediators in carrageenan-induced abdominal oedema in zebrafish model. *Inflammopharmacology*. Jan 11. [Epub ahead of print]
- Elinav E, Nowarski R, Thaïs CA, Hu B, Jin C, Flavell RA. (2013) Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat Rev Cancer*, 13:759–71.
- Elmore S. (2007) Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 35(4): 495–516.
- Espinosa-Diez C, Miguel V, Mennerich D, Kietzmann T, Sánchez-Pérez P, Cadenas S, Lamas S. (2015) Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol*. 6:183-97.
- Fahrer J & Kaina B. (2013) O6-methylguanine-DNA methyltransferase in the defense against N-nitroso compounds and colorectal cancer. *Carcinogenesis*. 34 (11):2435–42.

Feng Y, Sentani K, Wiese A, Sands E, Green M, Bommer GT, Cho KR, Fearon ER. (2013). Sox9 induction, ectopic Paneth cells and mitotic spindle axis defects in mouse colon adenomatous epithelium arising from conditional biallelic Apc inactivation. *Am J Pathol.* 183(2):493-503.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer:* 136:359–386.

Fontenelle ROS, Morais SM, Brito EHS, Brilhante RSN, Cordeiro RA, Nascimento NRF, Kerntopf MR, Sidrim JJC, Rocha MFG. (2008) Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian Caatinga biome. *J. Appl. Microbiol.* 104: 1383–1390.

Fraile JM, Manchado E, Lujambio A, Quesada V, Campos-Iglesias D, Webb T, Lowe SW, Lopez-Otin C, Freije JM. (2017) USP39 Deubiquitinase Is Essential for KRAS-Driven cancer. *J Biol Chem.* 2017 Feb 1. pii: jbc.M116.762757. [Epub ahead of print]

Francescone R, Hou V and Grivennikov SI. (2014) Microbiome, Inflammation, and Cancer. *The Cancer Journal.* 20(3): 181-189.

Francescone R, Hou V, Grivennikov SI. (2015) Cytokines, IBD, and colitis-associated cancer. *Inflammatory bowel diseases.* 21:409-18.

Freires IA, Denny C, Benso B, de Alencar SM, Rosalen PL. (2015) Antibacterial Activity of Essential Oils and Their Isolated Constituents against Cariogenic Bacteria: A Systematic Review. *Molecules*, 20(4):7329-58.

Fukasawa H, Furuya R, Yasuda H, Yamamoto T, Hishida A, Kitagawa M. (2014) Anti-cancer agent-induced nephrotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem*, 14(7):921-7.

Fukata M, Chen A, Vamadevan AS, Cohen J, Breglio K, Krishnareddy S, Hsu D, Xu R, Harpaz N, Dannenberg AJ, Subbaramaiah K, Cooper HS, Itzkowitz SH, Abreu MT. (2007) Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors. *Gastroenterology*, 133:1869–81.

Fulda S & Debatin KM. (2006) Sensitization for Anticancer Drug-Induced Apoptosis by Betulinic Acid. *Neoplasia.* 7(2):162–170.

Fulda S. (2010) Modulation of apoptosis by natural products for cancer therapy. *Planta Medica* 76:1075-1079.

Furtado AA, Torres-Rêgo M, Lima MCJS, Bitencourt MAO, Estrela AB, Silva NS, Siqueira EMS, Tomaz JC, Lopes NP, Silva-Júnior AA, Zucolotto SM, Fernandes-Pedrosa MF. (2016) Aqueous extract from *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae) leaves and its phenolic

compounds have anti-inflammatory activity in murine models of edema, peritonitis and air-pouch inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*, 192: 225–235.

Galadari S, Rahman A, Pallichankandy S, Thayyullathil F. (2017) Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? *Free Radic Biol Med*.104:144-164.

Galdiero MR, Bonavita E, Barajon I, Garlanda C, Mantovani A, Jaillon S. (2013) Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. *Immunobiology*, 218(11):1402-10.

Galluzzi L, Kroemer G. (2008) Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell*. 135(7):1161-3.

Gasparrini M, Forbes-Hernandez TY, Giampieri F, Afrin S, Alvarez-Suarez JM, Mazzoni L, Mezzetti B, Quiles JL, Battino M. (2017) Anti-inflammatory effect of strawberry extract against LPS-induced stress in RAW 264.7 macrophages. *Food Chem Toxicol*. doi: 10.1016/j.fct.2017.01.018. [Epub ahead of print]

Gebhardt C, Ne'meth J, Angel P, Hess J. (2006) S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer. *Biochemical Pharmacology*, 72:1622–1631.

Geromichalos GD, Alifieris CE, Geromichalou EG, Trafalis DT. (2016) Overview on the current status on virtual high-throughput screening and combinatorial chemistry approaches in multi-target anticancer drug discovery; Part II. *J BUON*. 21(6):1337-1358.

Giampietri C, Starace D, Petrungaro S, Filippini A, Ziparo E. (2014) Necroptosis: Molecular Signalling and Translational Implications. *International Journal of Cell Biology*. 2014:490275, 6p.

Gibbons DL, Byers LA, Kurie JM. (2014) Smoking, p53 Mutation, and Lung Cancer *Mol Cancer Res*. 12(1): 3–13.

Gilmore TD. (2014) NF-κB Signaling Pathway. [Acesso em 20 de janeiro de 2017. [acesso: 20 de janeiro de 2017]. Disponível em://www.cellsignal.com/contents/science-pathway-research-immunology-and-inflammation/nf-b-signaling-pathway/pathways-nfkb.

Gomes M, Teixeira AL, Coelho A, Araújo A, Medeiros R. (2014) The role of inflammation in lung cancer. *Adv Exp Med Biol*. 816:1-23.

Goodall ML, Cramer SD, Thorburny A. (2016) Autophagy RIPs into cell death. *Cell Cycle*, 15(22):3014–3015.

Graeser R, Esser N, Unger H, Fichtner I, Zhu A, Unger C, Kratz F. (2010) INNO-206, the (6-maleimidocaproyl hydrazone derivative of doxorubicin), shows superior antitumor efficacy compared to doxorubicin in different tumor xenograft models and in an orthotopic pancreas carcinoma model. *Invest New Drugs*, 28: 14-19.

Grahame-Smith DG, Aronson JK. (2004) Tratado de Farmacologia Clínica e Farmacoterapia. 3ª edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 398.

Grande E, Bolós MV, Arriola E. (2011) Targeting oncogenic ALK: a promising strategy for cancer treatment. *Mol Cancer Ther*, 10(4):569-79.

Greenberg AK, Tsay J, Tchou-Wong K, Jorgensen A, Rom WN. (2013) Chemoprevention of lung cancer: prospects and disappointments in human clinical trials. *Cancers*. 5(1):131–148.

Greene ER, Huang S, Serhan CN, Panigrahy D. (2011) Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids. *Prostaglandins other Lipid Mediat*. 96:27-36.

Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, Karin M. (2004) IKK β links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell*, 118 (3), 285-296.

Grisham MB, Beniot JN, Granger DN. (1990) Assessment of leukocyte involvement during ischemia and reperfusion of intestine. *Methods Enzymol*, 186: 729-742.

Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu GY, Vallabhapurapu S, Karin M. (2009) IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer cell*, 15(2), 103-113.

Grivennikov SI & Karin M. (2010) Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 21(1):11-9.

Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. (2010) Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140, 883–899.

Grivennikov SI, Wang K, Mucida D, Stewart CA, Schnabl B, Jauch D, Karin M. (2012) Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature*, 491(7423), 254-258.

Grivennikov SI. (2013) Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. *Semin Immunopathol* 35: 229-244.

Hajar R. Animal testing and Medicine. (2011) *Heart Views* 12(1):42.

Hamilton TC, Behrens BC, Louie KG, Ozols RF. Induction of progesterone receptor with 17beta-estradiol in human ovarian cancer. (1984) *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 59: 561-563.

Han J, Zhong CQ, Zhang DW. (2011) Programmed necrosis: backup to and competitor with apoptosis in the immune system. *Nature Immunology*, 12(12):1143–1149, 2011.

- Hanahan D & Weinberg RA. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144: 646-674.
- Hanahan D, Coussens LM. (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, 21(3): 309-322.
- Hansen EL, Sozer EB, Romeo S, Frandsen SK, Vernier PT, Gehl J. (2015) Dose-Dependent ATP Depletion and Cancer Cell Death following Calcium Electroporation, Relative Effect of Calcium Concentration and Electric Field Strength. *PLoS One*. 10(5):e0128034.
- Hasegawa H, Mizoguchi I, Chiba Y, Ohashi M, Xu M, Yoshimoto M. (2016). Expanding Diversity in Molecular Structures and Functions of the IL-6/IL-12 Heterodimeric Cytokine Family. *Front. Immunol*. 7:479.
- Hayden MS, Ghosh S. (2008) Shared Principles in NF- κ B Signaling. *Cell* 132.
- Hensing T, Chawla A, Batra R, Salgia R. (2014) A Personalized Treatment for Lung Cancer: Molecular Pathways, Targeted Therapies, and Genomic Characterization *Adv Exp Med Biol*. 799:85-117.
- Hespanhol VP. (2008) Tratamento do cancro do pulmão – Decisão baseada na biologia, do gene à histologia. *Rev. Port. Pneum*. 14(2):27-34.
- Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S, Bodmer JL, Schneider P, Seed B, Tschopp J. (2000) Fas triggers an alternative, caspase-8- independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat. Immunol*. 1:489–495
- Hu XY, Deng JG, Wang L, Yuan YF (2013). Synthesis and anti-tumor activity evaluation of gallic acid-mangiferin hybrid molecule. *Med Chem*. 9(8):1058-62.
- Hu Z, Wu H, Li Y, Hou Q, Wang Y, Li S, Xia B, Wu S. (2014) β -Elemene inhibits the proliferation of esophageal squamous cell carcinoma by regulating long noncoding RNA-mediated inhibition of hTERT expression. *Anti-Cancer Drugs*, 26(5):531–539.
- Huang PJ, Hseu YC, Lee MS, Senthil Kumar KJ, Wu CR, Hsu LS, Liao JW, Cheng IS, Kuo YT, Huang SY, Yang HL. (2012). In vitro and in vivo activity of gallic acid and *Toona sinensis* leaf extracts against HL60 humanpremyelocytic leukemia. *Food Chem Toxicol*. 50(10):3489-97.
- Huguet EL, MaMahon JA, McMahon AP, Bicknell R, Harris A. (1994) Differential expression of human Wnt genes 2, 3, 4, and 7B in human breast cell lines and normal and disease states of human breast tissue. *Cancer Res.*, 54: 2615-2621.
- Hur GM, Lewis J, Yang Q, Lin Y, Nakano H, Nedospasov S, Liu ZG. (2003) The death domain kinase RIP has an essential role in DNA damage-induced NF- κ B activation. *Genes Dev*. 17:873–882.

IARC - International Agency for Research on Cancer. (2011) Disponível em: <http://www.globocan.iarc.fr>. [Acesso em: 01 de janeiro de 2017].

IARC - International Agency for Research on Cancer. (2017) Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx> <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>. [Acesso: 20 de janeiro de 2017].

Ibrahim SF, Van den Engh G. (2007) Flow cytometry and cell sorting. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 106:19-39.

Iglesia N, Konopka G, Lim KL, Nutt CL, Bromberg JF, Frank DA, Mischel PS, Louis DN, Bonni A. (2008) Deregulation of a STAT3-IL8 Signaling Pathway Promotes Human Glioblastoma Cell Proliferation and Invasiveness. *J Neurosci.*, 28, 5870-5878.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. (2015) Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. [Acesso: 20 de janeiro de 2017]

INCA – Instituto Nacional do Câncer. (2017) Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: “<http://www.inca.gov.br>”. [Acesso: 19 de janeiro de 2017].

Irrazabal T, Belcheva A, Girardin SE, Martin A, Philpott DJ. (2014) The multifaceted role of the intestinal microbiota in colon cancer. *Molecular cell.* 54:309-20.

Irrazábal T, Belcheva A, Girardin SE, Martin A, Philpott DJ. (2014) The multifaceted role of the intestinal microbiota in colon cancer. *Mol. Cell*, 54:309–320.

Irrinki KM, Mallilankaraman K, Thapa RJ, Chandramoorthy HC, Smith FJ, Jog NR, Gandhirajan RK, Kelsen SG, Houser SR, May MJ, Balachandran S, Madesh M. (2011) Requirement of FADD, NEMO, and BAX/BAK for aberrant mitochondrial function in tumor necrosis factor alpha-induced necrosis. *Mol Cell Biol.* 31(18):3745-58.

Itharat A, Houghton PJ, Amooquaye E, Burke PJ, Sampson J, Raman, A. (2004) In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. *Journal of Ethnopharmacology*, 90: 33-39.

Ivanov II, Zhou L, Littman DR. (2007) Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. *Semin Immunol*, 19(6):409-17.

Iwakura Y, Nakae S, Saijo S, Ishigame H. (2008) The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. *Immunological Reviews*, v. 226, p. 57-79.

Iwamoto LH, Vendramini-Costa DB, Monteiro PA, Sousa IMO, Foglio MA, Carvalho JE, Rodrigues RAO. (2015) Anticancer and anti-inflammatory activities of standardized dichloromethane crude extract from *Piper umbellatum* leaves. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, ID 948737, 8p.

Jackstadt R & Sansom OJ. (2016) Mouse models of intestinal cancer. *J Pathol*, 238(2): 141–151.

Jančík S, Drábek J, Radzioch D, Hajdúch M. (2010) Clinical Relevance of KRAS in Human Cancers. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Volume 2010. Article ID150960, 13 p.

Jemal A, Thun MJ, Ries LA, Howe HL, Weir HK, Center MM, et al. (2008) Annual report to the nation on the status of cancer, 1975–2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control. *J Natl Cancer Inst*. 100:1672–94.

Ji BC, Hsu WH, Yang JS, Hsia TC, Lu CC, Chiang JH, Yang JL, Lin CH, Lin JJ, Suen LJ, Gibson Wood W, Chung JG. (2009) Gallic acid induces apoptosis via caspase-3 and mitochondrion-dependent pathways in vitro and suppresses lung xenograft tumor growth in vivo. *J Agric Food Chem*. 57(16):7596-604.

Jiang Y, Zhang W, Kondo K, Klco JM, Martin TB, Dufault MR, Madden SL, Kaelin WG, Nacht M. (2003) Gene Expression Profiling in a Renal Cell Carcinoma Cell Line: Dissecting VHL and Hypoxia-Dependent Pathways. *Mol Cancer Res*. 1(6):453-62.

Johns Hopkins Medicine Website. Disponível em: <http://www.hopkinscoloncancercenter.org/>. [Acesso em: 05 de janeiro de 2017].

Joyce JA, Pollard JW. (2009) Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*, 9: 239–252.

Jung JI, Kim EJ, Kwon GT, Jung YJ, Park T, Kim Y, Yu R, Choi MS, Chun HS, Kwon SH, Her S, Lee KW, Park JHY. (2015) β -Caryophyllene potently inhibits solid tumor growth and lymph node metastasis of B16F10 melanoma cells in high-fat diet-induced obese C57BL/6N mice. *Carcinogenesis*, 36(9):1028–1039.

Junio HA, Sy-Cordero AA, Ettefagh KA, Burns JT, Micko KT, Graf TN, Richter SJ, Cannon RE, Oberlies NH, Cech NB. (2011) Synergy-Directed Fractionation of Botanical Medicines: A Case Study with Goldenseal (*Hydrastis canadensis*). *J. Nat. Prod*. 74:1621–1629.

Júnior FE, de Oliveira DR, Boligon AA, Athayde ML, Kamdem JP, Macedo GE, da Silva GF, de Menezes IR, Costa JG, Coutinho HD, Kerntopf MR, Posser T. (2014) Protective effects of *Croton campestris* A. St-Hill in different ulcer models in rodents: evidence for the involvement of nitric oxide and prostaglandins. *J Ethnopharmacol.*, 153(2):469-77.

Karch J, Kanisicak O, Brody MJ, Sargent MA, Michael DM, Molkenstein JD. (2015) Necroptosis Interfaces with MOMP and the MPTP in Mediating Cell Death. *PLoS One*. 10(6):e0130520.

Karin M & Greten FR. (2005). NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol*, 5: 749-759.

Kashani HH, Hoseini ES, Nikzad H, Aarabi MH. (2012) Pharmacological properties of medicinal herbs by focus on secondary metabolites. *Life Sci. J*, 9 (1): 509–520.

Kawada M, Ohno Y, Ri Y, Ikoma T, Yuugetu H, Asai T, Watanabe M, Yasuda N, Akao S, Takemura G, Minatoguchi S, Gotoh K, Fujiwara H, Fukuda K. (2001) Anti-tumor effect of gallic acid on LL-2 lung cancer cells transplanted in mice. *Anticancer Drugs*, 12(10):847-52.

Kellar A, Egan C, Morris D. (2015) Preclinical Murine Models for Lung Cancer: Clinical Trial Applications. *BioMed Research International*. 2015: 621324, 17 p.

Khaybullin RN, Zhang M, Fu J, Liang X, Li T, Katritzky AR, Okunieff P, Qi X. (2014) Design and Synthesis of Isosteviol Triazole Conjugates for Cancer Therapy. *Molecules* (19): 18676-18689.

Khazir J, Riley DL, Pilcher LA, De-Maayer P, Mir BA. (2014) Anticancer agents from diverse natural sources. *Nat Prod Commun*, 9(11):1655-69.

Kim ER & Chang DK. (2014) Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the risk, pathogenesis, prevention and diagnosis. *World J. Gastroenterol*, 20:9872–9881.

Kingston DG & Newman DJ. (2005) The search for novel drug leads for predominately antitumor therapies by utilizing mother nature's pharmacophoric libraries. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 8(2):207-27.

Kingston DG. (2009) Tubulin-interactive natural products as anticancer agents. *J Nat Prod*, 72(3): 507-15.

Kmie Z, Cyman M, Slebioda TS. (2017) Cells of the innate and adaptive immunity and their interactions in inflammatory bowel disease. *Advances in Medical Sciences*, 62(1):1–16.

Kubo I, Asaka Y, Shibata K. (1991) Insect growth inhibitory nor-diterpenes, cis-dehydrocrotonin and trans-dehydrocrotonin, from *Croton cajucara*. *Phytochemistry*, 30(8): 2545-2546.

Kuraishy A, Karin M, Grivennikov SI. (2011) Tumor promotion via injury- and death-induced inflammation. *Immunity*. 35(4):467-77.

Lambert AJ & Brand MD. (2009) Reactive oxygen species production by mitochondria. *Methods Mol Biol*. 554:165-81.

- Lapa AJ, Souccar C, Lima-Landman MTR, Castro MAS, Lima TCM. (2008) Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. 5ª. Ed – Setor de Produtos Naturais, Departamento de Farmacologia, UNIFESP/EPM.
- Larry H. Russell, Jr, Elizabeth Mazzio, Ramesh B. Badisa, Zhi-Ping Zhu, Maryam Agharahimi, Ebenezer T. Oriaku, and Carl B. Goodman. (2012) Autoxidation of Gallic acid Induces ROS-dependant Death in Human Prostate Cancer LNCaP Cells. *Anticancer Res.*, 32(5): 1595–1602.
- Lavaud C, Massiot G, Barrera JB, Moretti C, Men-Olivier LL. (1994) Triterpene saponins from *Myrsine pellucida*. *Phytochemistry* 37(6): 1671-1677.
- Lee DS, Je JY. (2013) Gallic acid-grafted-chitosan inhibits food borne pathogens by a membrane damage mechanism. *J. Agric. Food Chem.* 61, 6574–6579.
- Lee SH, Kim JK, Kim DW, Hwang HS, Eum WS, Park J, Han KH, Oh JS, Choi SY. (2013) Antitumor activity of methyl gallate by inhibition of focal adhesion formation and Akt phosphorylation in glioma cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 4017–4029.
- Lee PN, Forey BA, Coombs KJ, Lipowicz PJ, Appleton S. (2016) Time trends in never smokers in the relative frequency of the different histological types of lung cancer, in particular adenocarcinoma. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 74:12-22.
- Li QQ, Lee RX, Liang H, Zhong Y. (2013) Anticancer activity of β -elemene and its synthetic analogs in human malignant brain tumor cells. *Anticancer Research*, 3(1): 65–76.
- Li YY, Huang SS, Lee MM, Deng JS, Huang GJ. (2015). Anti-inflammatory activities of cardamonin from *Alpinia katsumadai* through heme oxygenase-1 induction and inhibition of NF- κ B and MAPK signaling pathway in the carrageenan-induced paw edema. *Int. Immunopharmacol.* 25:332–339.
- Liao CL, Lai KC, Huang AC, Yang JS, Lin JJ, Wu SH, Gibson Wood W, Lin JG, Chung JG. (2012) Gallic acid inhibits migration and invasion in human osteosarcoma U-2 OS cells through suppressing the matrix metalloproteinase- 2/-9, protein kinase B (PKB) and PKC signaling pathways. *Food Chem. Toxicol.* 50: 1734–1740.
- Lima, E. O.; Gompertz, O. F.; Giesbrecht, A. M. and Paulo, M. Q. (1993) In vitro antifungal activity of essential oils obtained from officinal plants against dermatophytes. *Mycoses*, 36, 333-336.
- Lima KG. (2014) Avaliação do efeito do ácido gálico no tratamento de células de hepatocarcinoma HepG2. [Tese de doutorado] Porto Alegre: Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

- Linkermann A, Green DR. (2014) Necroptosis. *N. Engl. J. Med.* 370:455–465.
- Liu ST, Pham H, Pandol SJ, Ptasznik A. (2014) Src as the link between inflammation and cancer. *Front Physiol*, 4:416.
- Liu D, Yang P, Zhang YQ. (2016) Water-soluble extract of *Saxifraga stolonifera* has anti-tumor effects on Lewis lung carcinoma-bearing mice. *Bioorg Med Chem Lett.* 26(19):4671-8.
- Locatelli C, Filippin-Monteiro FB, Creczynski-Pasa TB. (2013) Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: a review. *Eur J Med Chem.* 60:233-9.
- Longato GB, Fiorito GF, Vendramini-Costa DB, de Oliveira Sousa IM, Tinti SV, Ruiz AL, de Almeida SM, Padilha RJ, Foglio MA, de Carvalho JE. (2015) Different cell death responses induced by eupomatenoid-5 in MCF-7 and 786-0 tumor cell lines. *Toxicol In Vitro.* 29(5):1026-33.
- Lozzio BB, Lozzio CB, Bamberger EG, Feliu AS. (1981) A multipotential leukemia cell line (K-562) of human origin. *Proc Soc Exp Biol Med.*, 166(4):546-50.
- Mann JR, Backlund MG, DuBois RN. (2005) Mechanisms of Disease: inflammatory mediators and cancer prevention. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2:202-210.
- Mantovani A. (2005) Cancer: inflammation by remote control. *Nature*, 435:752–753.
- Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F (2008) Cancer-related inflammation. *Nature* 454(7203):436–444.
- Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P. (2017) Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol.* doi: 10.1038/nrclinonc.2016.217. [Epub ahead of print].
- Mao JT, Cui X, Reckamp K, Liu M, Krysan K, Dalwadi H, Sharma S, Hazra S, Strieter R, Gardner B, Dubinett SM. (2005) Chemoprevention strategies with cyclooxygenase-2 inhibitors for lung cancer. *Clin Lung Cancer* 7(1):30–39.
- Marchetti GM. (2008) Atividade anticâncer do extrato bruto e das frações das folhas de *Calea pinnatifida* Banks. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo.
- Marley AR & Nan H. (2016) Epidemiology of colorectal cancer. *Int J Mol Epidemiol Genet*, 7(3):105-114.
- Matias EFF, Santos KKA, Almeida TS. (2010) Atividade antibacteriana in vitro de *Croton campestris* A., *Ocimum gratissimum* L. e *Cordia verbenácea* DC. *Brazilian Journal of Biosciences*, vol. 8 (3): 294-298.

Matic S, Stanic S, Mihailovic M, Bogojevic D. (2016) *Cotinus coggygria* Scop.: An overview of its chemical constituents, pharmacological and toxicological potential. Saudi Journal of Biological Sciences, 23:452–461.

Matsuzaki P. (2004) Avaliação dos extratos etanólico, resíduo butanólico e resíduo aquoso de *Pfaffia paniculata* sobre o crescimento do Tumor de Ehrlich em suas formas ascítica e sólida. Tese de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo (SP), Brasil.

Mauer J, Denson JL, Bruning JC. (2015) Versatile functions for IL-6 in metabolism and cancer Trends in Immunology, 36(2): 92-101.

Medzhitov R. (2010) Inflammation 2010: new adventures of an old flame. Cell, 140:771-76.

Melo-Lima S, Lopes MC, Mollinedo F. (2014) Necroptosis is associated with low procaspase-8 and active RIPK1 and -3 in human glioma cells Oncoscience 1(10):649-664.

Meltzer P, Leibovitz A, Dalton W, Villar H, Kute T, Davis J, Nagle R, Trent J. (1991) Establishment of two new cell lines derived from human breast carcinomas with HER-2/neu amplification. Br. J. Cancer 63: 727-735.

Mesquita ML, de Paula JE, Pessoa C, Moraes MO, Costa-Lotufo LV, Grougnet R, Michel S, Tillequin F, Espindola LS. (2009) Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. Journal of Ethnopharmacology, 123:439-445.

Meylan E & Tschopp J. (2005) The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress. Trends Biochem Sci 30, 151-9.

Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. (2016) Signaling via the NF-κB system. WIREs Syst Biol Med. 8:227–241.

Mocellin S, Verdi D, Pooley KA, Landi MT, Egan KM, Baird DM, Prescott J, De Vivo I, Nitti D. (2012) Telomerase reverse transcriptase locus polymorphisms and cancer risk: a field synopsis and meta-analysis. J. Natl. Cancer Inst. 104 (11): 840–54.

Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, Hose C, Langley J, Cronise P, Vaigro-Wolff A, Gray-Goodrich M, Campbell H, Mayo J, Boyd M. (1991) Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. Journal of the National Cancer Institute, 83: 757-766.

Monteiro LS, Bastos KX, Barbosa-Filho JM, Athayde-Filho PF, Diniz MFFM, Sobral MV. (2014) Medicinal Plants and Other Living Organisms with Antitumor Potential against Lung Cancer. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2014, ID 604152, 15 p.

Monteiro PA (2012). Atividade anticâncer de extratos e frações obtidos de *Croton campestris* A.St.-Hil. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo.

Monteiro PA, Vendramini-Costa D, Ruiz AL, Foglio AL, Carvalho JE. (2014) Antiproliferative and anti-inflammatory activity of fraction containing terpenes from *Croton campestris* A. St.-Hil. (Euphorbiaceae). *Planta Medica*, 80, 16 (resumo).

Morris CJ. (2003) Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods Mol Biol*. 225:115-21.

Motta LB, Furlan CM, Santos DYAC, Salatino MLF, Negri G, Carvalho JE, Monteiro PA, Ruiz ALTG, Caruzo MB, Salatino A. (2013) Antiproliferative activity and constituents of leaf extracts of *Croton sphaerogynus* Baill. (Euphorbiaceae). *Industrial Crops and Products*, 50:661– 665.

Nardi GM, Felippi R, DalBo S, Siqueira-Junior JM, Arruda DC, Delle Monache F, Timbola AK, Pizzolatti MG, Ckless K, Ribeiro-do-valle RM. (2003) Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Croton celtidifolius* bark. *Phytomedicine*, 10:176–184.

Nath R, Roy S, De B, Choudhury MD. (2013) Anticancer and antioxidant activity of Croton: a review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(2):63-70.

Naugler WE & Karin M. (2008) The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. *Trends Mol Med*, 14:109-19.

NCI – National Cancer Institute. (2017) Disponível em: <https://www.cancer.gov/>. [Acesso em 05 de fevereiro de 2017]

NCI – National Cancer Institute. Disponível em: https://dtp.cancer.gov/discovery_development/nci-60/nci-adres.htm. Acesso em 10/12/2016]

Negroni SC & Stronati L. (2015) Apoptosis, Necrosis, and Necroptosis in the Gut and Intestinal Homeostasis *Anna Mediators of Inflammation*, Article ID 250762, 10 p.

Neufert C, Becker C, Neurath MF. (2007) An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. *Nat Protoc*. 2(8):1998-2004.

Newman DJ e Cragg GM. (2012) Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J Nat Prod*, 75(3):311-335.

Newman D & Cragg GM. (2016) Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod.*, 79(3):629-61.

Ngadjui BT, Folefoc GG, Keumedjio F, Dongo E, Sondengam BL, Connolly JD. (1999) Crotonadiol, a labdane diterpenoid from the stem bark of *Croton zambesicus*. *Phytochemistry*, 51(1): 171–174.

Nishimura T, Andoh A, Inatomi O, Shioya M, Yagi Y, Tsujikawa T, Fujiyama Y. (2008) Amphiregulin and epiregulin expression in neoplastic and inflammatory lesions in the colon. *Oncol Rep*, 19(1):105-10.

Nobili S, Lippi D, Witort E, Donnicini M, Bausi L, Mini E, Capaccioli S. (2009) Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacol Res*, 59(6): 365-78.

Okayasu I, Yamada M, Mikami T, Yoshida T, Kanno J, Ohkusa T. (2002) Dysplasia and carcinoma development in a repeated dextran sulfate sodium-induced colitis model. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 17:1078–1083.

Otuki MF, Vieira-Lima FV, Lima FV, Malheiros A, Ynunes RA, Calixto JB. (2004) Topical antiinflammatory effects of the extract from *Portulaca oleraceae* and α -amyrin pentacyclic triterpene. *Eur J Pharmacol.*, 507(1-3): 253-9.

Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, Bao JK. (2012). Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif.* 45(6):487-98.

Ouyang L, Luo Y, Tian M, Zhang SY, Lu R, Wang JH, Kasimu R, Li X. (2014) Plant natural products: from traditional compounds to new emerging drugs in cancer therapy. *Cell Prolif.* 47:506-515.

Pandurangan AK, Mohebbi N, Esa NM, Looi CY, Ismail S, Saadatdoust Z. (2015a) Gallic acid suppresses inflammation in dextran sodium sulfate-induced colitis in mice:: Possible mechanisms. *Int Immunopharmacol.* 28(2):1034-43.

Pandurangan AK, Mohebbi N, Norhaizan ME, Looi CY. (2015b) Gallic acid attenuates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in BALB/c mice. *Drug Des Devel Ther.* 30(9):3923-34.

Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. (2005) A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*, 6(11):1133-41.

Park WH. (2016) Gallic acid induces HeLa cell death via increasing GSH depletion rather than ROS levels. *Oncol Rep*, 37(2):1277-1283.

- Park WH. (2017). Gallic acid induces HeLa cell death via increasing GSH depletion rather than ROS levels. *Oncol Rep.* 37(2):1277-1283.
- Parrales A & Iwakuma T. (2016) International Journal of Molecular Sciences Review p53 as a Regulator of Lipid Metabolism in Cancer *Int. J. Mol. Sci.* 17:2074.
- Parsons MJ & Green DR. (2010) Mitochondria in cell death. *Essays In Biochemistry*, Jun:4799-114.
- Payne JK. (2014) State of science: Stress, Inflammation, and Cancer. *Oncology Nursing Forum*, 41(5):533-40.
- Pereira A, Bester M, Soundy P, Apostolides Z. (2016) Antiproliferative properties of commercial *Pelargonium sidoides* tincture, with cell-cycle G0/G1 arrest and apoptosis in Jurkat leukaemia cells. *Pharm Biol.* 54(9):1831-40.
- Peres CM, Curi R. (2005) Como cultivar células. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A, 283p.
- Perlikos F, Harrington KJ, Syrigos KN. (2013) Key molecular mechanisms in lung cancer invasion and metastasis: A comprehensive review *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 87:1–11.
- Phan AN, Hua TN, Kim MK, Vo VT, Choi JW, Kim HW, Rho JK, Kim KW, Jeong Y. (2016) Gallic acid inhibition of Src-Stat3 signaling overcomes acquired resistance to EGF receptor tyrosine kinase inhibitors in advanced non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, 7:34.
- Pisolato R, Lombardi AP, Vicente CM, Lucas TF, Lazari MF, Porto CS. (2016) Expression and regulation of the estrogen receptors in PC-3 human prostate cancer cells. *Steroids*, 107:74-86.
- Pitot HC. (1993) The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer*. 72(3):962-70.
- Porta C, Larghi P, Rimoldi M, Totarob MG, Allavenac P, Mantovanic A, Sica A. (2009) Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer. *Immunobiology* 214:761–777.
- Posadas I, Bucci M, Roviezzo F, Rossi A, Parente A, Sautebin L, Cirino G. (2004) Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression, *Br. J. Pharmacol.* 142:331–338.
- Prajapati VD, Maheriya PM, Jani GK, Solanki HK. (2014) Carrageenan: a natural seaweed polysaccharide and its applications. *Carbohydrate polymers*. 105:97–112.
- Prata EMR, Paulo MQ, Brito ARMS. (1993) Isolamento do princípio ativo de *Croton campestris* St.Hil. (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Farmácia*, 74(2): 36-41.

- Priolli DG, Canello TP, Lopes CO, Valdívia JCM, Martinez NP, Açari DP, Cardinali IA, Ribeiro ML. (2013) Oxidative DNA damage and β -catenin expression in colorectal cancer evolution. *Int J Colorectal Dis*, 28:713–722
- Puebla P, López JL, Guerrero M, Carrón R, Martinez ML, Román LS, Feliciano AS. (2003) Neo-clerodane diterpenoids from *Croton schiedeana*. *Phytochemistry*, 62(4): 551–555.
- Queiroz M., Valadares MC, Bincoletto C, Dieamant GC. (2004) Ehrlich ascites tumor as a tool in the development of compounds with immunomodulatory properties. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 26(4):511–25.
- Raj L, Ide T, Gurkar AU, Foley M, Schenone M, Li X, Tolliday NJ, Golub TR, Carr SA, Shamji AF, Stern AM, Mandinova A, Schreiber SL, Lee SW. (2011) Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS. *Nature*. 475(7355):231-4.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. (2007) *Farmacologia*. 6ª edição, Elsevier, Rio de Janeiro, 718.
- Rastogi RP, Singh SP, Häder DP, Sinha RP. (2010) Detection of reactive oxygen species (ROS) by the oxidant-sensing probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937. *Biochem Biophys Res Commun*. 397(3):603-7.
- Robbins SL, Contran, RS, Kumar V, Abbas AK, Fausto N. (2004) *Patologia - Bases Patológicas das Doenças*. 7ª Edição. Rio de Janeiro. Editora Elsevier, 1616p.
- Ronchi JA, Vercesi AE, Castilho RF. (2011) Reactive oxygen species and permeability transition pore in rat liver and kidney mitoplasts. *J. Bioenergy Biomembr*. 43(6)709–715.
- Rosell R & Karachaliou N. (2015). Optimizing lung cancer treatment approaches. *N. Nat. Rev. Clin. Oncol*. 12:75–76.
- Rozza AL, de Mello Moraes T, Kushima H, Nunes DS, Hérula-Lima CA, Pellizzon CH. (2011) Involvement of glutathione, sulfhydryl compounds, nitric oxide, vasoactive intestinal peptide, and heat-shock protein-70 in the gastroprotective mechanism of *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae) essential oil. *J Med Food*, 9:1011-7.
- Rubinstein LV, Shoemaker RH, Paull KD, Simon RM, Tosini S, Skehan P, Scudiero DA, Monks A, Boyd MR. (1990) Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. *Journal of National Cancer Institute*, 82: 1113-1118.

Ruiz RB & Hernandez PS. (2014) Diet and cancer: Risk factors and epidemiological evidence. *Maturitas*, 77:202–208.

Russell LH, Mazzio E, Badisa RB, Zhu ZP, Agharahimi M, Oriaku ET, Goodman CB. (2012) Autoxidation of Gallic acid Induces ROS-dependant Death in Human Prostate Cancer LNCaP Cells. *Anticancer Res.* 32(5):1595-1602.

Safarzadeh E, Shotorbani SS, Baradaran B. (2014) Herbal Medicine as Inducers of Apoptosis in Cancer Treatment. *Adv Pharm Bul* 4(1):421-427.

Safe S, Kasiappan R (2016) Natural Products as Mechanism-based Anticancer Agents: Sp Transcription Factors as Targets. *Phytother Res.* 11:1723-1732.

Saint-Hilaire, Auguste de S141p.Pm Plantas usuais dos brasileiros / Auguste de Saint-Hilaire ; organizado por Maria das Graças Lins Brandão e Marc Pignal ; tradução de Cleonice Paes Barreto Mourão e Consuelo Fortes Santiago - Belo Horizonte : Fino Traço, 2014. 344 p.

Sakai M, Ferraz-de-Paula V, Pinheiro ML, Ribeiro A, Quinteiro-Filho WM, Rone MB, Martinez-Arguelles DB, Dagli ML, Papadopoulos V, Palermo-Neto J. (2010) Translocator protein (18kDa) mediates the pro-growth effects of diazepam on Ehrlich tumor cells in vivo. *Eur J Pharmacol.* 626(2-3): 131–138.

Salatino A, Salatino MLF, Negri G. (2007) Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of Croton species (Euphorbiaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol 18, 1:11-33.

Salgado FLL, Artigiani-Neto R, Lopes-Filho GJ. (2016) Growth factors and COX2 in wound healing: an experimental study with Ehrlich Tumors. *Arq. Bras. Cir. Dig.* 29(4).

Salgia R, Hensing T, N Campbell, Salama AK, Maitland M, Hoffman F, Villaflor V, Vokes EE. (2011) Personalized Treatment of Lung Cancer. *Seminars in Oncology.* 38(2): 274–283.

Salucci M, Stivala LA, Maiani G, Bugianesi R, Vannini V. (2002) Flavonoids uptake and their effect on cell cycle of human colon adenocarcinoma cells (Caco2). *Br. J. Cancer* 86:1645-1651.

Sandler RS, Halabi S, Baron JA, Budinger S, Paskett E, Keresztes R, Petrelli N, Pipas JM, Karp DD, Loprinzi CL, Steinbach G, Schilsky R. (2003) A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.*, 348:883–890.

Santos GKN, Dutra KA, Lira CS, Lima BN, Napoleão TH, Paiva PMG, Maranhão CA, Brandão SSF, Navarro DMAF. (2014) Effects of *Croton rhamnifolioides* Essential Oil

on *Aedes aegypti* Oviposition, Larval Toxicity and Trypsin Activity. *Molecules*, 19(10):16573-16587.

Santos PML, Schripsema J, Kuster RM. (2005) Flavonóides O-glicosilados de *Croton campestris* St. Hill. (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15(4): 321-325.

Sasaki T, Hiroki K, Yamashita W. (2013) The Role of Epidermal Growth Factor Receptor in Cancer Metastasis and Microenvironment. *BioMed Research International* Volume 2013, Article ID 546318, 8 p.

Sátiro LN & Roque N. (2008) A família Euphorbiaceae nas caatingas arenosas do médio rio São Francisco, BA, Brasil. *Acta botânica brasileira*, 22(1): 99-118.

Schenk B & Fulda S. (2015) Reactive oxygen species regulate Smac mimetic/TNF α -induced necroptotic signaling and cell death. *Oncogene* 34, 5796-5806.

Schottenfeld D & Beebe-Dimmer J. (2006). Chronic Inflammation: A Common and Important Factor in the Pathogenesis of Neoplasia. *CA Cancer J Clin*, 56:69-83.

Shalapour S & Karin M. (2015) Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil. *J Clin Invest*. 125(9):3347–3355.

Shan BE, Hao JS, Li QX and Tagawa M. (2006) Antitumor activity and immune enhancement of murine interleukin-23 expressed in murine colon carcinoma cells. *Cell Mol Immunol*, 3:47-52.

Shaw AT, Kim DW, Mehra R et al. Ceritinib in ALKrearranged non-small-cell lung cancer. (2014) *The New England Journal of Medicine*. 370:1189–1197.

Shokri H. (2016) A review on the inhibitory potential of *Nigella sativa* against pathogenic and toxigenic fungi. *Avicenna J Phytomed* 6(1): 21-33.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. (2015) Cancer statistics, 2015. *CA: a cancer journal for clinicians*. 65:5-29.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. (2016) Cancer Statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*, 66(1): 7-30.

Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, de Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR (2004) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5ª edição, Editora da Universidade, Florianópolis, 229-245.

Sinclair L, Lewis V, Collins SJ, Haigh CL. (2013) Cytosolic caspases mediate mislocalised SOD2 depletion in an in vitro model of chronic prion infection. *Dis Model Mech*. 6(4):952-63.

Singh A, Fatima K, Srivastava A, Khwaja S, Priya D, Singh A, Mahajan G, Alam S, Saxena AK, Mondhe DM, Luqman S, Chanda D, Khan F, Negi AS. (2016) Anticancer activity of gallic acid template-based benzylidene indanone derivative as microtubule destabilizer. *Chem Biol Drug Des.*, 88(5):625-634.

Siu D. (2011) Natural products and their role in cancer therapy. *Med Oncol*, 28(3):888-900.

Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of National Cancer Institute*, 82: 1107-1118.

Smetana K, Lacina L, Szabo P, Dvoranková B, Broz P, SEDO A. (2016) Review Ageing as an Important Risk Factor for Cancer. *Anticancer Research*, 36:5009-5018.

Smith JA, Ngo H, Martin MC, Wolf JK. (2005) An Evaluation of Cytotoxicity of the Taxane and Platinum Agents Combination Treatment in a Panel of Human Ovarian Carcinoma Cell Lines. *Gynecologic Oncology*, 98: 141-145.

Souza WA, Negrão AJM, Filho CG, Ferreira VH, Lino RS, Freitas RE, Biazotto G, Pereira DM. (2008) Toxicidade de antineoplásicos: revisão bibliográfica. *Revista científica eletrônica de medicina veterinária*, 11: 1679-7353.

Souza AWS, Júnior DM, Araújo JAP, Catelan TTT, Cruvinel WM, Andrade LEC, Silva NP. (2010) Sistema Imunitário – Parte III O delicado equilíbrio do sistema imunológico entre os pólos de tolerância e autoimunidade. *Rev Bras Reumatol*, 50(6):665-94.

Souza Chagas AC, de Sena Oliveira MC, Giglioti R, Santana RC, Bizzo HR, Gama PE, Chaves FC. (2016) Efficacy of 11 Brazilian essential oils on lethality of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Ticks Tick Borne Dis*, 7(3):427-32.

Souza CO, Teixeira AA, Biondo LA, Silveira LS, Calder P, Rosa Neto JC. (2017). Palmitoleic acid reduces the inflammation in LPS stimulated macrophages by inhibition of NFκB, independently of PPARs. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. doi: 10.1111/1440-1681.12736. [Epub ahead of print].

Stewart BW, Wild C P. (2014) World cancer report (WHO). Disponível em: <http://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014>. [Acesso em: 01 de fevereiro de 2017].

Su Z, Yang Z, Xi L, DeWitt JP, Chen Y. (2016) Cancer therapy in the necroptosis era. *Cell Death and Differentiation* 23:748–756.

- Subramanian AP, Jaganathan SK, Mandal M, Supriyanto E, Muhamad II. (2016) Gallic acid induced apoptotic events in HCT-15 colon cancer cells. *World J Gastroenterol*, 22(15):3952-61.
- Sun G, Zhang S, Xie Y, Zhang Z, Zhao W. (2016) Gallic acid as a selective anticancer agent that induces apoptosis in SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Lett*, 11(1):150-158.
- Sutthivaiyakit S, Nareeboon P, Ruangrangsri N, Ruchirawat S, Pisutjaroenpong S, Mahidol C. (2001) Labdane and pimarane diterpenes from *Croton joufra*. *Phytochemistry*, 56(8): 811–814.
- Takahashi T, Nau MM, Chiba I, Birrer MJ, Rosenberg RK, Vinocour M, Levitt M, Pass H, Gazdar AF, Minna JD. (1989) p53: A frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science*, 246: 491-494.
- Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T et al. (1999) Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*. 11 (4), 443-451.
- Tan S, Guan X, Grün C, Zhou Z, Schepers U, Nick P. Gallic acid induces mitotic catastrophe and inhibits centrosomal clustering in HeLa cells. (2015). *Toxicology in Vitro*, 30(1):506–513.
- Tanaka T, Kohno H, Suzuki R, Yamada Y, Sugie S, Mori H. (2003) A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci*. 94:965–973.
- Tang J, Xiao L, Cui R, Li D, Zheng X, Zhu L, Sun H, Pan Y, Du Y, Yu X. (2016) CX3CL1 increases invasiveness and metastasis by promoting epithelial-to-mesenchymal transition through the TACE/TGF- α /EGFR pathway in hypoxic androgen-independent prostate cancer cells. *Oncol Rep*. 35(2):1153-62.
- Terzic J, Grivennikov S, Karin E, Karin M (2010) Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*, 138:2101–2114.
- Thaker AI, Shaker A, Rao MS, Ciorba MA. (2012) Modeling Colitis-Associated Cancer with Azoxymethane (AOM) and Dextran Sulfate Sodium (DSS). *J. Vis. Exp.* (67), e4100 doi:10.3791/4100.
- Thamsermsang O, Akarasereenont P, Laohapand T, Panich U. (2017) IL-1 β -induced modulation of gene expression profile in human dermal fibroblasts: the effects of Thai herbal Sahatsatara formula, piperine and gallic acid possessing antioxidant properties. *BMC Complement Altern Med.*, 17(1):32.

Thapa RJ, Basagoudanavar SH, Nogusa S, Irrinki K, Mallilankaraman K, Slifker MJ, Beg AA, Madesh M, Balachandran S. (2011). NF- κ B Protects Cells from Gamma Interferon-Induced RIP1-Dependent Necroptosis. *Mol Cell Biol*, 31(14): 2934–2946.

Todoric J, Antonucci L, Karin M. (2016) Targeting Inflammation in Cancer Prevention and Therapy. *Cancer Prev Res*. 9(12):895–905.

Tornatore L, Thotakura AK, Bennett J, Moretti M, Franzoso G. (2012) The nuclear factor kappa B signaling pathway: integrating metabolism with inflammation. *Trends in cell biology*. 22(11):557–566.

Torre LA, Siegel RL, Jemal A. (2016a) Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends—An Update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 25(1):16-27.

Torre LA, Siegel RL, Jemal A. (2016b) Lung Cancer Statistics. *Adv Exp Med Biol*. 893:1-19.

Tortola L, Nitsch R, Penninger JM. (2016) TNF-driven cell fate: till HACE do us part. *Oncotarget*, 7(29):44871-44872.

Tsang MS, Jiao D, Chan BC, Hon KL, Leung PC, Lau CB, Wong EC, Cheng L, Chan CK, Lam CW, Wong CK. (2016). Anti-Inflammatory Activities of Pentaherbs Formula, Berberine, Gallic Acid and Chlorogenic Acid in Atopic Dermatitis-Like Skin Inflammation. *Molecules*, 21(4):519.

Tseng HH, Chen PN, Kuo WH, Wang JW, Chu SC, Hsieh YS. (2012) Antimetastatic potentials of *Phyllanthus urinaria* L on A549 and Lewis lung carcinoma cells via repression of matrix-degrading proteases. *Integr Cancer Ther*. 3:267-78.

Turiel NA, Ribeiro AF, Carvalho EE, Domingos VD, Lucas FC, Carreira LM, Andrade EH, Maia JG. (2013) Essential oils composition of croton species from the Amazon. *Nat Prod Commun*, 8(10):1471-2.

Turovskaya O, Foell D, Sinha P, Vogl T, Newlin R, Nayak J, Nguyen M, Olsson A, Nawroth PP, Bierhaus A, Varki N, Kronenberg M, Freeze HH, Srikrishna G. (2008) RAGE, carboxylated glycans and S100A8/A9 play essential roles in colitis-associated carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 29(10):2035-43.

Ulrich-Merzenich WG. (2009) Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, 16:97-110.

Van der Meeren HL. (1987) Dodecyl gallate, permitted in food, is a strong sensitizer. *Contact Dermatitis*. 16(5):260-2.

Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 11(10):700-14.

Vendramini-Costa DB, de Castro IB, Ruiz AL, Marquissolo C, Pilli RA, de Carvalho JE (2010) Effect of goniothalamine on the development of Ehrlich solid tumor in mice. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 18(18): 6742-7.

Vendramini-Costa, DB. (2012) Goniotalamina: atividade antitumoral e anti-inflamatória. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) – Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, 2012.

Vendramini-Costa DB & Carvalho JE. (2012) Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. *Current Pharmaceutical Design*. 18(26):3831-52.

Vendramini-Costa DB, Monteiro KM, Iwamoto LH, Jorge MP, Tinti SV, Pilli RA, Carvalho JE. (2014) Gastroprotective effects of goniothalamine against ethanol and indomethacin-induced gastric lesions in rats: Role of prostaglandins, nitric oxide and sulfhydryl compounds. *Chemico-Biological Interactions* doi:10.1016/j.cbi.2014.10.025.

Vendramini-Costa DB, Spindola HM, de Mello GC, Antunes E, Pilli RA, Carvalho JE. (2015) Anti-inflammatory and antinociceptive effects of racemic goniothalamine, a styryl lactone *Life Sciences*, 139:83–90.

Vendramini-Costa DB, Francescone R, Posocco D, Hou V, Dmitrieva O, Hensley H, de Carvalho JE, Pilli RA, Grivennikov SI. (2017) Anti-inflammatory natural product goniothalamine reduces colitis-associated and sporadic colorectal tumorigenesis. *Carcinog*. 38(1):51-63.

Ventura JJ, Hubner A, Zhang C, Flavell RA, Shokat KM, Davis RJ. (2006) Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK. *Mol. Cell* 21:701–710.

Verma S, Singh A, Mishra A. (2013) Gallic acid: molecular rival of cancer. *Environ Toxicol Pharmacol*. 35(3):473-85.

Vichai V & Kirtikara K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols* 1(3): 1112 – 1116.

- Vunda SL, Sauter IP, Cibulski SP, Roehe PM, Bordignon SA, Rott MB, Apel MA, Poser GL. (2012) Chemical composition and amoebicidal activity of *Croton pallidulus*, *Croton ericoides* and *Croton isabelli* (Euphorbiaceae) essential oils. *Parasitol Res*, 111(3):961-6.
- Wang S, Liu Z, Wang L, Zhang X. (2009) NF- κ B Signaling Pathway, Inflammation and Colorectal Cancer, *Cellular & Molecular Immunology*, 6(5):327-334.
- Wang J, Wang Y et al (2012) Chronic epithelial NF-kappaB activation accelerates APC loss and intestinal tumor initiation through iNOS up-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:14007–14012.
- Wang H, Sun L, Su L et al. (2014) Mixed lineage kinase domainlike protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3. *Molecular Cell* 54(1):133– 146.
- Wang K, Karin M. (2015) Tumor-Elicited Inflammation and Colorectal Cancer. *Adv Cancer Res*. 128:173-96.
- Wang H, Yin Y, Wang P, Xiong C, Huang L, Li S, Li X, Fu L. (2016a) Current situation and future usage of anticancer drug databases. *Apoptosis*, 21(7):778-94.
- Wang J, Li H, Li B, Gong Q, Chen X, Wang Q. (2016b) Co-culture of bone marrow stem cells and macrophages indicates intermediate mechanism between local inflammation and innate immune system in diabetic periodontitis. *Exp Ther Med*. 12(2):567-572.
- Weinberg RA. (2008) A biologia do câncer. 1ª edição, Artmed, Porto Alegre, 864p.
- Wen X, Lin ZQ, Liu B, Wei YQ. (2012) Caspase-mediated programmed cell death pathways as potential therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*. 45(3)
- West L, Vidwans SJ, Campbell NP et al. (2012) A novel classification of lung cancer into molecular subtypes. *PLoS ONE*. 7(2):e31906.
- WHO – World Health Organization. (2017) Disponível em: <http://www.who.int/cancer/en/>. [Acesso em 02 de janeiro de 2017].
- Wilson VG. Growth and differentiation of HaCaT keratinocytes. (2014) *Methods Mol Biol*, 1195:33-41.
- Wong H, Choo EF, Alicke B, Ding X, La H, McNamara E, Theil FP, Tibbitts J, Friedman LS, Hop CE, Gould SE. (2012) Antitumor activity of targeted and cytotoxic agents in murine subcutaneous tumor models correlates with clinical response. *Clin Cancer Res*. 15;18(14):3846-55.

Yan D, Geusz ME, Jamasbi RJ. (2012) Properties of lewis lung carcinoma cells surviving curcumin toxicity. *J Cancer*. 3:32-41.

Yannai S. (2012) Dictionary of Food Compounds. 2. ed. CRC Press.

Yao YQ, Ding X, Jia Y, Huang C, Wang Y, Xu Y. (2008) Anti-tumor effect of β -elemene in glioblastoma cells depends on p38 MAPK activation. *Cancer Letters*, 264(1):127-134.

Yeh RD, Chen JC, Lai TY, Yang JS, Yu CS, Chiang JH et al. (2011) Gallic Acid Induces G0/G1 Phase Arrest and Apoptosis in Human Leukemia HL-60 Cells through Inhibiting Cyclin D and E, and Activating Mitochondria-dependent Pathway. *Anticancer Research* 31: 2821-2832.

Yuan J & Kroemer G. (2010) Alternative cell death mechanisms in development and beyond. *Gen & Develop* 24:2592–2602.

Yunes RA & Cechinel V. (2012). Química de Produtos Naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. 3.ed. Itajaí: Univali Editora. 384p.

Zandi E, Rothwart DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M. (1997) The I κ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, I κ B α and I κ B β , necessary for I κ B phosphorylation and NF- κ B activation. *Cell*. 91:243-52.

Zhang SQ, Kovalenko A, Cantarella G, Wallach D. (2000) Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKK γ) upon receptor stimulation. *Immunity* 12, 301-11.

Zhan P, Qian Q, Yu LK. (2013) Prognostic value of COX-2 expression in patients with nonsmall cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Thoracic Dis* 5(1):40–47.

Zhao Y, Mu X, Du G. (2016) Microtubule-stabilizing agents: New drug Discovery and cancer therapy. *Pharmacol Ther*, 162:134-43.

Zhou J, He LL, Ding XF, Yuan QQ, Zhang JX, Liu SC, Chen G. (2016) Combinatorial Antitumor Effect of Rapamycin and β -Elemene in Follicular Thyroid Cancer Cells. *BioMed Research International*, 2016:6723807.

APÊNDICE

Primeira descrição botânica de Croton campestris A.St.-Hil.

CROTON CAMPESTRIS. CRÓTON DOS CAMPOS. Família das Euforbiáceas. C. foliis obovatis, vix dentatis, utrinque dense tomentosis; floribus masculis 15-andris; fæmineorum stylis 2-partitis. Nome vulgar: Velame do Campo. Descrição. Toda a planta é coberta, sobretudo em direção à extremidade, por um feltro acinzentado, amarelado, esbranquiçado nos brotos jovens, formado pelo entrecruzamento de tricomas estrelados, extremamente numerosos. RAMOS cilíndricos na parte inferior, achatados na extremidade. FOLHAS alternas, mais curtas e mais próximas umas das outras, à medida em que se dirigem para a base dos ramos, de uma a uma e meia polegada de comprimento, 4 a 8 linhas de largura, obovais, ligeiramente denteadas, mas como que inteiras por causa do feltro que preenche o intervalo dos dentes, percorridas na face inferior por uma nervura mediana, ligeiramente saliente: pecíolos medindo de duas a 3 linhas de comprimento. ESTÍPULAS quase invisíveis. FLORES unissexuais, dispostas no ápice dos ramos em espigas, medindo de uma a duas polegadas de comprimento; as flores femininas, em número de duas a cinco, um pouco afastadas e situadas na parte inferior; as flores masculinas por cima, com pedicelos curtos; numerosas, próximas umas das outras e enoveladas: as brácteas são curtas e desaparecem sob a espessa penugem que cobre todas essas partes. FLORES MASCULINAS: CÁLICE dividido até perto da base em cinco sépalas ovais, com uma linha de comprimento, cobertas por fora de tricomas estrelados, longos e moles, glabros por dentro; sua prefloração é valvar. 5 PÉTALAS alternando com as sépalas, um pouco mais longas que elas, ovais, glabras, esbranquiçadas. 5 GLÂNDULAS no contorno do receptáculo, alternando com a inserção das pétalas. RECEPTÁCULO revestido de tricomas numerosos, brancos, longos e moles. ESTAMES em número de quinze, um pouco mais longos que as pétalas, ligeiramente desiguais entre si; filetes glabros dobrados para dentro do botão, um pouco recurvados na flor: anteras adnatas pelo dorso ao ápice dos filetes; ovais, biloculares, abrindo-se por duas fendas longitudinais. PÓLEN (visto na água) com grãos globulosos, amarelos e lisos. FLORES FEMININAS: CÁLICE muito curto, quinquepartido, com sépalas lineares, agudas, velutinas, cada uma sustentando uma glândula colada 290 à base; 5 outras glândulas bem pequenas, como que pediceladas, alternando com as precedentes: enfim, nenhuma corola. ESTILETES em número de três, divididos profundamente em dois ramos arredondados no ápice, glabros, enegrecidos. OVÁRIO duas vezes mais longo que o cálice, coberto de tricomas estrelados, bastante longos e entrecruzados em todos os

sentidos: três lóculos e, em cada um deles, um óvulo único, suspenso abaixo do ápice ao ângulo interno por um curto funículo, ovoide, glabro, tendo por cima uma carúncula chanfrada por dentro. O fruto não foi observado. Localidades. Essa espécie foi colhida em campos artificiais perto de Congonhas da Serra, vilarejo situado nas montanhas da parte ocidental da província de Minas. Estava florida no mês de novembro. Usos. Sua raiz é purgativa: é usada contra as doenças sifilíticas.

ANEXOS

1. Resumo publicado

Resumo publicado na revista *Planta Medica* referente ao trabalho apresentado no 62nd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research – GA 2014, Guimarães, Portugal.

Monteiro et al. (2014). Antiproliferative and anti-inflammatory activity of fraction containing terpenes from *Croton campestris* A.St-Hil. (Euphorbiaceae). *Planta Medica*, 2014:80-P2O43.

Planta Med 2014; 80 - P2O43
DOI: 10.1055/s-0034-1395034

Antiproliferative and anti-inflammatory activity of fraction containing terpenes from *Croton campestris* A. St.-Hil. (Euphorbiaceae)

P Monteiro ^{1, 2}, D Vendramini-Costa ¹, AL Ruiz ¹, MA Foglio ¹, JE Carvalho ^{1, 2}

¹Chemical, Biological and Agricultural Pluridisciplinary Research Center (CPQBA), University of Campinas (UNICAMP), Paulínia-SP, 13148 – 218, Brazil

²Post Graduate Program in Structural and Cell Biology, Institute of Biology (IB), University of Campinas (UNICAMP), Campinas-SP, 13083 – 970, Brazil

Congress Abstract

Croton campestris A. St.-Hil. (Euphorbiaceae) has been used in folk medicine as anti-inflammatory and antitumor treatment [1]. Our aim was evaluate anticancer and anti-inflammatory properties of the fraction CFqb14 obtained from *C. campestris* on *in vitro* and *in vivo* experimental models respectively. *C. campestris* leaves were extracted with ethyl acetate and crude extract was fractionated by column chromatograph (silica gel 1:10) with gradients of polarity solvents. The antiproliferative activity was evaluated on 8 human cancer cell lines. After 48h of treatment, cell viability was determined by sulforhodamine B assay. Fraction CFqb14 was evaluated in paw edema model by inoculation of carrageenan in the right hind paw of balb/C female mice. Five groups were treated intraperitoneally with vehicle (NaCl 0.9%), indomethacin 20 mg/kg (positive control) and CFqb14 1.25, 2.5 and 5 mg/kg 30 min before carrageenan inoculation. The edema was measured 1.5, 3, 4.5, 6, 24, 48, 72 and 96h after edema induction. Early inflammation phase inhibition was observed and, considering the high expression of COX-2 of NCI-H460 (lung) and relating anti-proliferative activity with selectivity mainly for that cell line (GI₅₀ = 0.21 µg/mL), the *in vivo* anti-inflammatory activity may be related to COX-2 inhibition and consequently reduction of prostaglandin production, a fundamental mediator of early phase of inflammation process. Fraction's composition was screened by Thin Layer Chromatography (TLC) via exposure to chemical reagents as cerium sulfate and Liebermann-Burchard specific for terpenes. The phytochemical reagents analysis identified terpenes as major compounds in the CFqb14, suggesting that these compounds are related to anticancer and anti-inflammatory activity observed. Further studies to identify the mechanism of action and the active principles are in progress. All protocols were approved by Committee for Ethics in Animal Research at the State University of Campinas protocol 3026 – 1.

Keywords: antiproliferative, anti-inflammatory, *in vivo*, *Croton campestris*, cancer

2. Artigos publicados em coautoria:

Trabalho realizado em colaboração com o Prof. Dr. Luiz Fernando da Silva Júnior do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Figueiredo et al. (2013). Iodine-Catalyzed Aza-Prins Cyclization: Metal-Free Synthesis and Antiproliferative Activity of Hexahydrobenzo[f]isoquinolines. *Synthesis*, 45(8):1076-1082.

PAPER

A

Iodine-Catalyzed Aza-Prins Cyclization: Metal-Free Synthesis and Antiproliferative Activity of Hexahydrobenzo[f]isoquinolines

Carlos A. M. Figueiredo,^a K. R. Kishore K. Reddy,^a Paula A. Monteiro,^b João E. de Carvalho,^b Ana L. T. G. Ruiz,^b Luiz F. Silva, Jr.^{*a}

^a Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 748, CP 26077, CEP 05513-970 São Paulo SP, Brazil
Fax +55(128)155579; E-mail: luizfsjr@iq.usp.br

^b Divisão de Farmacologia e Toxicologia, Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), UNICAMP, CP6171, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

Received: 30.01.2013; Accepted after revision: 25.02.2013

Abstract: A series of hexahydrobenzo[f]isoquinolines were synthesized by an iodine-catalyzed aza-Prins cyclization under metal-free conditions. An aliphatic or an aromatic aldehyde can be used as the carbonyl component in this reaction, which can also be performed efficiently under solvent-free conditions. During this study, we discovered new compounds with moderate antitumor activities.

Key words: cyclizations, iodine, catalysis, heterocycles, amines, aldehydes, antitumor agents

were lower, although still within the practical range (entries 4 and 5). We also performed the reaction with aromatic aldehydes, including aldehydes substituted with electron-withdrawing and or electron-donating groups, and the reaction times in these cases were as much as three days (entries 6–8). The nitro-substituted aldehyde **2h** gave a low yield of the corresponding product (entry 8). We also investigated the behavior of cinnamaldehyde (**2i**) in the aza-Prins reaction with **1**, and we found that it gave the

Trabalho realizado em colaboração com o Prof. Dr. Antonio Salatino do Instituto de Biosciências da Universidade de São Paulo.

Motta et al. (2013). Antiproliferative activity and constituents of leaf extracts of *Croton sphaerogynus* Baill. (Euphorbiaceae). *Industrial Crops and Products*, 50:661-665.

Industrial Crops and Products 50 (2013) 661–665

Contents lists available at ScienceDirect

Industrial Crops and Products

journal homepage: www.elsevier.com/locate/indcrop






Antiproliferative activity and constituents of leaf extracts of *Croton sphaerogynus* Baill. (Euphorbiaceae)

Lucimar B. Motta^{a,*}, Cláudia M. Furlan^a, Deborah Y.A.C. Santos^a, Maria L.F. Salatino^a,
Giuseppina Negri^b, João E. de Carvalho^c, Paula A. Monteiro^c, Ana Lúcia T.G. Ruiz^c,
Maria B. Caruzo^d, Antonio Salatino^a

^a Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do Matão, 277, CEP 05508-090 São Paulo, SP, Brazil
^b Departamento de Psicobiologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil
^c Divisão de Farmacologia e Toxicologia, CPQBA – CP 6171, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970 Campinas, SP, Brazil
^d Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 29 April 2013
Received in revised form 17 June 2013
Accepted 2 August 2013

Keywords:
Croton sphaerogynus
Euphorbiaceae
Antiproliferative activity
Diterpenes
Podocarpanes
Abietanes

ABSTRACT

Several *Croton* species have been used in traditional medicine and contain substances active against cancer, such as diterpenoids and alkaloids. *Croton sphaerogynus* is a shrub from the Atlantic Rain Forest in southeastern Brazil. The main goal of this study was to characterize the main constituents of the leaf extracts of *C. sphaerogynus* and evaluate their *in vitro* antiproliferative activity against tumor cell lines. Hexane, dichloromethane and methanol extracts of leaves were analyzed by GC/MS and evaluated for their *in vitro* antiproliferative activity on the cell lines 786-O (kidney), HT-29 (colon), K562 (leukemia), NCI-ADR/RES (drug resistant ovary), NCI-H460 (lung), MCF-7 (mammary), PC-3 (prostate), OVCAR-3 (ovary), U251 (glioma) and UACC-62 (melanoma). Relevant constituents in dichloromethane and hexane extracts were abietane, podocarpane and clerodane type furano diterpenes. Dichloromethane and hexane extracts exhibited activity against NCI-H460 (GI₅₀ 0.26 µg/mL and 0.33 µg/mL, respectively) and K562 (GI₅₀ 0.60 µg/mL and <0.25 µg/mL, respectively). Taking into account all cell lines tested, the dichloromethane extract was shown to have higher activity (mean log GI₅₀ 0.86) than hexane and methanol extracts (mean log GI₅₀ 1.26 and 1.49, respectively). The antiproliferative activity observed in the present work is probably accounted for by the abietane and/or podocarpane diterpenes.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

Trabalho realizado em colaboração com o Profa. Dra. Beatriz Helena Sales Maia do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná.

Canzi et al. (2014). Prenylated Flavonoids from Roots of *Dahlstedtia glaziovii* (Fabaceae). *J. Braz. Chem. Soc.*, 25(6):995-1001.

Article

<http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20140071>

J. Braz. Chem. Soc., Vol. 25, No. 6, 995-1001, 2014.
Printed in Brazil • ©2014 Sociedade Brasileira de Química
0103 • 5053 \$6.00+0.00



Prenylated Flavonoids from Roots of *Dahlstedtia glaziovii* (Fabaceae)

Edione F. Canzi,^a Francisco A. Marques,^a Sirlei D. Teixeira,^b Ana Maria G. A. Tozzi,^c
Marcos J. Silva,^d Renata Maria T. Duarte,^e Marta Cristina T. Duarte,^e Ana Lúcia T. G. Ruiz,^f
Paula A. Monteiro,^f João E. de Carvalho^f and Beatriz Helena L. N. Sales Maia^{*a}

^aDepartamento de Química, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Centro Politécnico,
Jardim das Américas, P.O. Box 19081, 81531-990 Curitiba-PR, Brazil

^bDepartamento de Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR),
P.O. Box 571, 85503-390 Pato Branco-PR, Brazil

^cDepartamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas
(Unicamp), P.O. Box 6109, 13083-970 Campinas-SP, Brazil

^dInstituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás (UFG),
P.O. Box 131, 74001-970 Goiânia-GO, Brazil

^eDivisão de Microbiologia and ^fDivisão de Farmacologia e Toxicologia, CPQBA, Universidade
Estadual de Campinas (Unicamp), P.O. Box 6171, 13083-970 Campinas-SP, Brazil

O estudo fitoquímico das raízes de *Dahlstedtia glaziovii* (Fabaceae) forneceu um novo dibenzoilmetano (glaziovione), juntamente com dezoito compostos conhecidos. Suas estruturas foram determinadas através de métodos espectroscópicos de ressonância magnética nuclear (NMR) 1D e 2D (correlação heteronuclear única quântica, HSQC, e correlação heteronuclear de múltipla ligação, HMBC) e espectrometria de massas de alta resolução (HRMS). A atividade antiproliferativa foi investigada para os extratos, para os dibenzoilmetanos 2'-metóxi-8-(α - α -dimetilalil)-furano-[4'',5'':3',4']-dibenzoilmetano, 3,4-metilenodioxo-2'-metóxi-8-(α - α -dimetilalil)-furano-[4'',5'':3',4']-dibenzoilmetano e pongamol, e para as flavonas lanceolata B, karanjina, pongapina e 3',4'-metilenodioxo-2'',2''-dimetilpirano-[5'',6'':8,7]-flavona. Os dibenzoilmetanos foram mais ativos do que as flavonas. A atividade antimicrobiana foi investigada para os extratos, sendo que estes não se apresentaram ativos.

Trabalho realizado em colaboração com o Prof. Dr. Ronaldo Pilli do Instituto de Química da UNICAMP.

Barcelos et al. (2014). Design and Synthesis of N-Acylated Aza-Goniothalamine Derivatives and Evaluation of Their in vitro and in vivo Antitumor Activity. *ChemMedChem*, 9(12):2725-43.

CHEM MED CHEM
FULL PAPERS



DOI: 10.1002/cmdc.201402292

Design and Synthesis of N-Acylated Aza-Goniothalamine Derivatives and Evaluation of Their in vitro and in vivo Antitumor Activity

Rosimeire Coura Barcelos,^[a] Julio Cezar Pastre,^[a] Débora Barbosa Vendramini-Costa,^[a, b] Vanessa Caixeta,^[a] Giovanna Barbarini Longato,^[b, c] Paula Araújo Monteiro,^[b, c] João Ernesto de Carvalho,^[b, d] and Ronaldo Aloise Pilli*^[a]

Herein we describe the synthesis of a focused library of compounds based on the structure of goniothalamine (1) and the evaluation of the potential antitumor activity of the compounds. N-Acylation of aza-goniothalamine (2) restored the in vitro antiproliferative activity of this family of compounds. 1-(E)-But-2-enoyl-6-styryl-5,6-dihydropyridin-2(1H)-one (18) displayed enhanced antiproliferative activity. Both goniothalamine (1) and derivative 18 led to reactive oxygen species generation in PC-3 cells, which was probably a signal for caspase-dependent apoptosis. Treatment with derivative 18 promoted Annexin V/7-aminoactinomycin D double staining, which indicated

apoptosis, and also led to G₂/M cell-cycle arrest. In vivo studies in Ehrlich ascitic and solid tumor models confirmed the antitumor activity of goniothalamine (1), without signs of toxicity. However, derivative 18 exhibited an unexpectedly lower in vivo antitumor activity, despite the treatments being administered at the same site of inoculation. Contrary to its in vitro profile, aza-goniothalamine (2) inhibited Ehrlich tumor growth, both on the ascitic and solid forms. Our findings highlight the importance of in vivo studies in the search for new candidates for cancer treatment.

Trabalho realizado em colaboração com a Divisão de Fitoquímica do Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da UNICAMP.

Iwamoto et al. (2015). Anticancer and Anti-Inflammatory Activities of a Standardized Dichloromethane Extract from *Piper umbellatum* L. Leaves. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015:948737.

Evid Based Complement Alternat Med. 2015; 2015: 948737.
Published online 2015 Feb 3. doi: [10.1155/2015/948737](https://doi.org/10.1155/2015/948737)


PMCID: PMC4332971

Anticancer and Anti-Inflammatory Activities of a Standardized Dichloromethane Extract from *Piper umbellatum* L. Leaves

[Leilane Hespporte Iwamoto](#), ^{1, 2} [Débora Barbosa Vendramini-Costa](#), ^{2, 3, *} [Paula Araújo Monteiro](#), ² [Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz](#), ^{1, 2} [Ilza Maria de Oliveira Sousa](#), ² [Mary Ann Foglio](#), ^{1, 2, 4} [João Ernesto de Carvalho](#), ^{1, 2, 4} and [Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues](#) ^{1, 2}

[Author information](#) ► [Article notes](#) ► [Copyright and License information](#) ►

Abstract

Go to: 

Despite the advances in anticancer drug discovery field, the worldwide cancer incidence is remarkable, highlighting the need for new therapies focusing on both cancer cell and its microenvironment. The tumor microenvironment offers multiple targets for cancer therapy, including inflammation. Nowadays, almost 75% of the anticancer agents used in chemotherapy are derived from natural products, and plants are an important source of new promising therapies. Continuing our research on *Piper umbellatum* species, here we describe the anticancer (*in vitro* antiproliferative activity and *in vivo* Ehrlich solid tumor model) and anti-inflammatory (carrageenan-induced paw edema and peritonitis models) activities of a standardized dichloromethane extract (SDE) from *P. umbellatum* leaves, containing 23.9% of 4-nerolidylcatechol. SDE showed *in vitro* and *in vivo* antiproliferative activity, reducing Ehrlich solid tumor growth by 38.7 and 52.2% when doses of 200 and 400 mg/kg, respectively, were administered daily by oral route. Daily treatments did not produce signals of toxicity. SDE also reduced paw edema and leukocyte migration on carrageenan-induced inflammation models, suggesting that the anticancer activity of SDE from *Piper umbellatum* leaves could involve antiproliferative and anti-inflammatory effects. These findings highlight *P. umbellatum* as a source of compounds against cancer and inflammation.

3. Autorização de acesso ao patrimônio genético – CNPQ – 010358/2014-5

14/02/2014

CNPq - Detalhe de Solicitações



Número do Processo: 010358/2014-5
 Nome: João Ernesto de Carvalho
 Data Envio: 08/05/2014 11:37:16
 Setor: COAPG/DABS
 CA: 68

IDENTIFICAÇÃO - PROJETO		
NÚMERO DO PROCESSO	LINHA DE FOMENTO/CHAMADA	
010358/2014-5	Patrimônio Genético / Autorização de Acesso ao PG (Pesquisa Científica)	
COMITÊ ASSESSOR		
68 - PROGRAMA DE BIODIVERSIDADE		
ÁREA DE CONHECIMENTO		
Biologia Geral		
MODALIDADE DE CONTRATAÇÃO	CA DE JULGAMENTO	
Individual	68 - PROGRAMA DE BIODIVERSIDADE	

DADOS DO SOLICITANTE		
PROPONENTE	CPF	TITULAÇÃO MÁXIMA
<u>João Ernesto de Carvalho</u>	012.410.818-08	Doutorado
DATA DE NASCIMENTO	SEXO	E-MAIL
06/09/1954	Masculino	carvalho@cpqba.unicamp.br
END RESIDENCIAL	TELEFONE RESIDENCIAL	NACIONALIDADE
Rua Dr. Emílio Ribas, 140 - Apto. 104 - Campinas SP	19 - 32513526	Brasileiro
FAX		
INSTITUIÇÃO PROPONENTE		
UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas (Rua da Reitoria s/nº Campinas) reitor@reitoria.unicamp.br		
ÁREA DE ATUAÇÃO DO PROPONENTE		
<ul style="list-style-type: none"> - Ciências Biológicas/Plantas Medicinais - Ciências Biológicas/Drogas Antineoplásicas - Ciências Biológicas/Drogas Antitumorogênicas - Ciências Biológicas/Drogas Antiinflamatórias - Ciências Biológicas/Toxicologia Pré Clínica - Ciências da Saúde/Alimentos Funcionais 		

INSTITUIÇÕES - PROJETO	
FUNÇÃO	NOME
Vínculo Institucional	UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas
Executora/Sede	UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas
Acesso da Amostra	UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas

DADOS GERAIS - PROJETO		
TÍTULO		
ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E MECANISMO DE AÇÃO DE PRINCÍPIOS ATIVOS COM ATIVIDADE ANTICÂNCER OBTIDOS DE CROTON CAMPESTRIS A.ST.-HIL		
SIGLA	DATA DE INÍCIO	DURAÇÃO
	10/05/2014	24 mês(es)
PALAVRAS CHAVE	HOME PAGE DO PROJETO	

<http://fomento.cnpq.br/fomento/detalheProposta.do?relado=apresentar&codProposta=4234046&numeroProtocolo=5413345280434281>

114

14/7/2014

CNPq - Detalhe de Solicitações

anticancer; Croton campestris; princípios ativos; frações;

RESUMO NÃO SIGILOSO

O aumento na expectativa de vida e hábitos que aumentam a exposição à carcinógenos, como fumo, álcool e má alimentação, vêm promovendo um aumento na incidência de câncer já que o envelhecimento do organismo, assim como a ação de agentes cancerígenos, favorece o aparecimento dessa doença, que atualmente é a segunda causa de morte da população. As células tumorais caracterizam-se por ignorar os sinais externos e internos que regulam a proliferação celular, evitam os processos de apoptose e diferenciação, com elevada capacidade para invasão e metástase. Grande parte dos quimioterápicos utilizados atualmente no tratamento do câncer advém de pesquisas desenvolvidas a partir de fontes naturais. A atividade anticâncer dos extratos obtidos das folhas da *Croton campestris* A.St.-Hil foi avaliada inicialmente pela Divisão de Farmacologia e Toxicologia em projeto financiado pela Fapesp (Fapesp-Bioprospecta 2004/07943-9), que fez a triagem de 200 extratos de espécies vegetais do Estado de São Paulo. O projeto atual tem como objetivo isolar e identificar os princípios ativos com atividade anticâncer, bem como determinar seu mecanismo de ação. Nesse trabalho, as vias celulares envolvidas na atividade antitumoral bem como a avaliação de outras ações corroborativas dessa atividade, como a inibição de processos metastáticos e de angiogênese, serão avaliadas. Para tal, o processo de extração, fracionamento, isolamento e identificação dos princípios ativos serão biomonitorados através do teste de atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais humanas. As linhagens com maior seletividade aos princípios ativos serão selecionadas para estudos de mecanismo de morte celular via citometria de fluxo, sendo também avaliados os marcadores celulares de morte como p53, p21, bcl-2, entre outros que viabilizarão a avaliação das vias de morte envolvidas. A partir dos resultados obtidos em cultura de células, os princípios ativos serão avaliados em modelos experimentais (in vivo) de tumor sólido de Ehrlich e través do implante em camundongos de fibras semipermeáveis (hollow fiber), contendo células tumorais humanas, a fim de avaliar a eficácia dos componentes ativos frente aos processamentos metabólicos envolvidos nesses modelos. O estudo é pioneiro para a essa espécie vegetal e leva ao objetivo futuro de prover um novo composto para o tratamento do câncer.

OBJETIVO

Identificar os componentes químicos antitumorais e analisar os mecanismos de ação envolvidos na atividade anticâncer dos componentes bioativos da espécie brasileira *Croton campestris* A.St.-Hil.

INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES - BIODIVERSIDADE**TIPO**

- Acesso
- Coleta

COMPONENTES DO PATRIMÔNIO GENÉTICO A SEREM ACESSADOS (GRUPOS TAXONÔMICOS):

Croton campestris A.St.-Hil. (Euphorbiaceae)

INDICAR PREVISÃO DE COLETA DE ESPÉCIES AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO DE ENDEMISMO ESTRITO (IDENTIFICAR ESPÉCIES):

Espécie não ameaçada de extinção.

TIPO / QUANTIDADE DE AMOSTRA

Coleta de 5kg das folhas da espécie (1kg por indivíduo)

REQUER SIGILO DE ALGUMA INFORMAÇÃO

Não

LOCALIZAÇÕES DE COLETA

UF	MUNICÍPIO	LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA	ÁREA	COLETA
SP	Paulínia	-22.787753, -47.111908	Privada	In situ

PIEL DEPOSITÁRIA**INSTITUIÇÃO**

Universidade Estadual de Campinas

COLEÇÃO

Herbário do Instituto de Biologia da UNICAMP

FONTES DE FINANCIAMENTOS**NOME**

UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas

VALOR

50.000,00

PROCESSO**ÁREAS DO CONHECIMENTO - PROJETO**

Biologia Geral

DOCUMENTOS ANEXOS

[Projeto de Pesquisa](#)

14/02/2014

CNPq - Detalhes de Solicitações

EQUIPE - PROJETO				
NOME	FUNÇÃO NO PROJETO	TITULAÇÃO MÁXIMA	ÁREAS DE ATUAÇÃO	
João Ernesto de Carvalho	Coordenador	Doutorado	<ul style="list-style-type: none"> - Ciências Biológicas/Plantas Medicinais - Ciências Biológicas/Drogas Antineoplásicas - Ciências Biológicas/Drogas Antiulcerogênicas - Ciências Biológicas/Drogas Antiinflamatórias - Ciências Biológicas/Toxicologia Pré Clínica - Ciências da Saúde/Alimentos Funcionais 	
CPF	DATA DE NASCIMENTO	PAÍS DE NASCIMENTO	EMAIL	NACIONALIDADE
012.410.818-08	06/09/1954	Brasil	carvalho@cpqba.unicamp.br	Brasileiro
Paula Araújo Monteiro	Bolsista	Doutorado	<ul style="list-style-type: none"> - Ciências Biológicas/Farmacologia - Ciências Biológicas/Biologia Geral 	
CPF	DATA DE NASCIMENTO	PAÍS DE NASCIMENTO	EMAIL	NACIONALIDADE
337.229.268-58	11/04/1985	Brasil	p035140@dac.unicamp.br	Brasileiro
Mary Ann Foglio	Colaborador	Doutorado	<ul style="list-style-type: none"> - Ciências da Saúde/Farmacognosia - Ciências da Saúde/Análise e Controle de Medicamentos - Ciências Exatas e da Terra/Química dos Produtos Naturais - Ciências Exatas e da Terra/Estrutura, Conformação e Estereoquímica - Ciências da Saúde/Moléculas Biologicamente Ativas - Ciências Biológicas/Produtos Naturais 	
CPF	DATA DE NASCIMENTO	PAÍS DE NASCIMENTO	HOME PAGE CV	EMAIL
096.776.818-77	21/11/1960	Inglaterra	Mary Ann Foglio	foglioma@cpqba.unicamp.br
Glyn Mara Figueira	Colaborador	Doutorado	<ul style="list-style-type: none"> - Ciências Agrárias/Pré-Processamento de Produtos Agrícolas - Ciências Agrárias/Plantas Medicinais - Ciências Biológicas/Microbiologia 	
CPF	DATA DE NASCIMENTO	PAÍS DE NASCIMENTO	EMAIL	NACIONALIDADE
057.205.448-36	06/11/1962	Brasil	glyn@cpqba.unicamp.br	Brasileiro
DECLARAÇÃO				

<http://efomento.cnpq.br/efomento/detalheProposta.do?metodo=apresentar&codProposta=4224046&numeroProtocolo=5413246280434281>

3/4

14/7/2014

CNPq - Detalhe de Solicitações

Ao encaminhar este formulário ao CNPq o solicitante, na qualidade de Coordenador do Projeto, declara formalmente ter conhecimento da Convenção sobre Diversidade Biológica, da Medida Provisória n.º 2.186-16/2001, dos Decretos n.º 3.945/2001 e n.º 4.946/2003, das deliberações do CGEN e dos requisitos do CNPq (disponível em [Resolução Normativa CNPq nº003/2012](#)). Declara, também, concordar com o [Termo de Compromisso](#) e que a presente solicitação de Autorização de Acesso e/ou Remessa de Amostra de Componente do Patrimônio Genético é única e exclusivamente para fins de pesquisa científica, estando ciente que o descumprimento das condições aqui estabelecidas sujeita o infrator às sanções previstas na legislação vigente.

(Declaração feita em observância aos artigos 297-301 do [Código Penal Brasileiro](#)).

NOME

CPF

[João Ernesto de Carvalho](#)

012.410.818-08

Declaração registrada eletronicamente através da internet junto ao CNPq, mediante uso de senha pessoal do solicitante em 08/05/2014 11:37:16, sob o número de protocolo 5413245280434281

4. Depósito de pedido de patente – INPI BR 102012017745-5



Composição farmacêutica para tratamento de câncer



Pesquisadores da Unicamp desenvolveram uma composição medicamentosa para o tratamento de câncer. A composição contém extrato de *Croton campestris* e testes mostraram que a composição levava as células tumorais tratadas a apresentar uma redução na proliferação celular, além de induzi-las à morte celular.

Pode ser aplicada em:

- Tratamento de câncer.

Os diferenciais desta tecnologia são:

- Redução significativa da evolução do tumor, sem suprimir a produção de leucócitos.

STATUS DA PATENTE

Pedido de patente de invenção depositado junto ao INPI.

CÓDIGO INTERNO

564_CROTON

MAIS INFORMAÇÕES:

parcerias@nova.unicamp.br

Tel: (19) 3521.2607 / 2612

(19) 3521.5013 / 2552

www.inova.unicamp.br



<p>18/07/2012 018120026054 12:15 DESP</p> <p>BR 10 2012 017745 5</p>	<p>Espaço para etiqueta</p>
DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO	
<p>Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial: O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas</p>	
<p>1. Depositante (71):</p> <p>1.1 Nome: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP</p> <p>1.2 Qualificação:</p> <p>1.3 CNPJ/CPF: 46068425/0001-33</p> <p>1.4 Endereço Completo:</p> <p>1.5 CEP: 13083-970 1.6 Telefone: 19 3521-5015 1.7 Fax: 19 3521-5210</p> <p>1.8 E-mail: patentes@inova.unicamp.br</p> <p style="text-align: right;"><input checked="" type="checkbox"/> continua em folha anexa</p>	
<p>2. Natureza: <input checked="" type="radio"/> Invenção <input type="radio"/> Modelo de Utilidade <input type="radio"/> Certificado de Adição</p> <p>Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: INVENÇÃO</p>	
<p>3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54):</p> <p>- *COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO EXTRATO DE <i>Croton campestris</i> BEM COMO AS FRAÇÕES PROVENIENTES DA UNIÃO DE FRAÇÕES PREVIAMENTE OBTIDAS DO EXTRATO E SEU USO EM COMPOSIÇÕES MEDICAMENTOSAS DESTINADAS</p>	

5. Os experimentos in vivo realizados no Fox Chase Cancer Center – Philadelphia, PA, EUA foram aprovados pelo Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC-FCCC)

Os protocolos de manutenção, pesquisa e eutanásia dos animais estão de acordo com os princípios e métodos adotados pelo National Institutes of Health (NIH) e foram aprovados pelo comitê de ética em pesquisa com animais do Fox Chase Cancer Center sob os números de protocolo #13-5, #13-6 e #14-12.

6. Os experimentos in vivo realizados no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPOBA) foram aprovados pela Comissão de Ética em Uso Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP (CEUA)



UNICAMP



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "**Croton campestris: avaliação do potencial antiinflamatório em modelo de edema de orelha (extrato bruto, frações e exsudado foliar) e avaliação da toxicidade aguda e mecanismos de ação antiulcerogênica do exsudado foliar**" (protocolo nº **3732-1**), sob a responsabilidade de **Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho / Paula Araujo Monteiro**, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em **09 de março de 2015**.

Campinas, 09 de março de 2015.

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>



CEUA/Unicamp

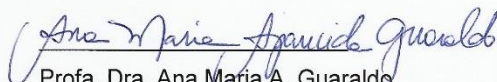
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

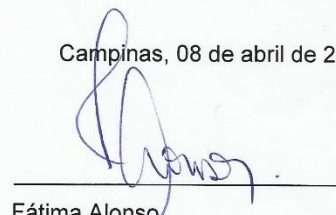
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Atividade antiulcerogênica dos extratos brutos, frações e látex de folhas de *Croton campestris A St Hil*" (protocolo nº 3027-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho / Paula Araujo Monteiro, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 08 de abril de 2013.

Campinas, 08 de abril de 2013.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>



CEUA/Unicamp

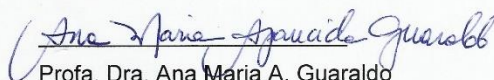
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Atividade antiinflamatória dos extratos e frações de *Croton campestris* A St Hil" (protocolo nº 3026-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho / Paula Araujo Monteiro, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 08 de abril de 2013.

Campinas, 08 de abril de 2013.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva



UNICAMP



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

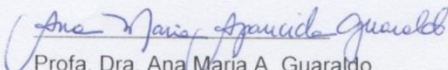
CERTIFICADO

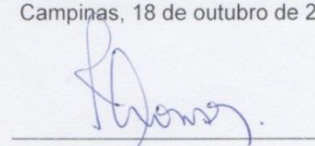
Certificamos que o Protocolo nº 2281-1, sobre "Teste de toxicidade aguda de extratos e frações do gênero Croton", sob a responsabilidade de Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho / Paula Araújo Monteiro, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 18 de outubro de 2010

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 2281-1, entitled " _____ ", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on October 18, 2010.

Campinas, 18 de outubro de 2010.


Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>



UNICAMP

CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

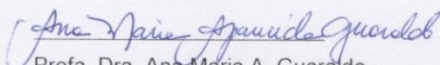
CERTIFICADO

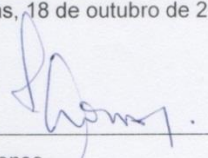
Certificamos que o Protocolo nº 2280-1, sobre "Avaliação da atividade de extratos do gênero Croton sobre modelo de Tumor Sólido de Ehrlich", sob a responsabilidade de Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho / Paula Araújo Monteiro, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 18 de outubro de 2010

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 2280-1, entitled "_____", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on October 18, 2010.

Campinas, 18 de outubro de 2010.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp


CERTIFICADO

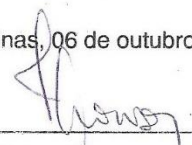
Certificamos que o projeto "Avaliação de atividade antiinflamatória de frações e princípios ativos de Croton campestris em modelo de peritonite em camundongos" (protocolo nº 3622-1), sob a responsabilidade de João Ernesto de Carvalho / Paula Araújo Monteiro, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 06 de outubro de 2014.

Campinas, 06 de outubro de 2014.


Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Presidente

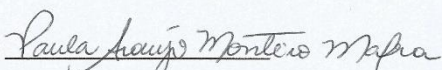

Fátima Alonso
Secretária Executiva

7. Declaração de direitos autorais

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha coautoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos à arbitragem, que constam da minha Tese de Doutorado, intitulada "*Croton campestris* A.St.-Hil. : atividades antitumoral e anti-inflamatória", não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 03 de abril de 2017

Assinatura: 

Nome da autora: Paula Araujo Monteiro

RG n.º 40.851.881 – 9 SSP-SP

Assinatura: 

Nome do orientador: João Ernesto de Carvalho

RG n.º 4.335.875 SSP-SP